

Aus dem
Institut für Physiologische Chemie
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. Jan Koolmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Messung von L-Asparaginase-Antikörper-Titern
von pädiatrischen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie
der Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology
unter Einsatz eines epitopspezifischen ELISA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stefan Angermeier aus Bad Karlshafen
Marburg/Lahn, 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am: 25.06.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund
Referent: Prof. Dr. K.-H. Röhm
1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. R. M. Nüsing

ZUSAMMENFASSUNG	
EINLEITUNG	1
1.1 Überblick	1
1.2 Historische Entwicklung	3
1.3 Biochemische Eigenschaften	4
1.4 Pharmakodynamik	5
1.5 Pharmakokinetik	8
1.6 Präparate	10
1.7 Klinischer Stellenwert	12
1.8 Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie	14
1.9 Nebenwirkungen	16
1.9.1 Toxische Effekte	16
1.9.2 Immunologische Reaktionen	19
1.9.2.1 Antikörperformation	20
1.9.2.2 Klinische Hypersensitivitätsreaktion	22
1.9.2.3 „Stille Inaktivierung“	24
1.10 Methoden zur Messung von L-Asparaginase-Antikörpern	25
1.11 Zielsetzung der Arbeit	26
MATERIAL UND METHODEN	29
2. MATERIAL	29
2.1 Chemikalien	29
2.2 Enzyme	29
2.3 Antikörper	29
2.4 Vektor	30
2.5 Bakterienstamm	30
2.6 Verbrauchsmaterialien	30
2.7 Geräte	30
2.8 PC-Programme und Internet-Links	30
2.9 Statistische Auswertung	31
2.10 Patientenmaterial	31
3. METHODEN	34
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	34
3.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmungen	35
3.1.4 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	35
3.1.5 Klonierung	35
3.1.5.1 Restriktion	35
3.1.5.2 Dephosphorylierung	36
3.1.5.3 Ligation	36
3.1.5.4 Transformation	36
3.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	37
3.2.1 Bakterienwachstum	37
3.2.2 Kultivierung	37
3.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	38
3.3.1 Proteinexpression	38
3.3.2 Proteinaufreinigung	39
3.3.2.1 Aufschluss der "Inclusion Bodies"	39

3.3.2.2 Affinitätschromatographie	40
3.3.4 Entfernung des GST-Anteils	41
3.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	42
3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
3.3.7 Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
3.4 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	44
3.4.1 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern unter Einsatz eines epitop- spezifischen ELISA	44
ERGEBNISSE	46
4.1 Herstellung der Genfragmente	46
4.2 Expression der GST-Fusionsproteine.....	47
4.3 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	48
4.4 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern.....	49
4.4.1 Messung von Anti-Asparaginase-IgG (Kaninchen)	50
4.4.2 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern in Patientenseren	50
4.5 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern nach Abtrennung von GST	62
4.6 Bindung von Antikörpern an den GST-Anteil.....	63
4.7 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern bei Patienten mit einer Hypersensitivitätsreaktion	64
4.8 Vergleich der Titer gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein mit den Titern gegen die GST-Fusionsproteine.....	65
4.9 ELISA.....	69
4.9.1 Bestimmung der Coating-Antigenkonzentration.....	69
4.9.1.1 L-Asparaginase-Gesamtprotein	69
4.9.1.2 Negativkontrolle.....	69
4.9.1.3 GST-Fusionsproteine	70
4.9.2 Reaktivität des Peroxidase-konjugierten Anti-Human IgG	71
4.9.3 Linearität der Serumproben.....	72
4.9.4 Intra- und Inter-Assay-Variabilität	74
DISKUSSION	75
5.1 Grundlegendes	75
5.2 Material und Methoden	78
5.3 Klinische Fragestellung	82
5.3.1 „Stille Inaktivierung“ und Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine ...	83
5.3.2 „Stille Inaktivierung“ und Antikörpertiter gegen das L-Asparaginase- Gesamtprotein.....	87
5.4 Ausblick	90
LITERATURVERZEICHNIS.....	92
ANHANG	99
6.1 Peptidsequenzen	99
6.2 Primersequenzen.....	100
6.3 Sequenz Vektor pGEX-6P-3	100
6.4 Sequenz <i>E. coli</i> L-Asparaginase (Asparaginase medac)	102
Abbildungsverzeichnis	103
Tabellenverzeichnis	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate(6)] diammonium salt
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asp	L-Asparaginase
ASY	L-Asparagin-Synthetase
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
COV	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
Da	Dalton
DNA	desoxyribonucleic acid
DDT	1,4-Dithiothreit
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
IgG	Immunglobulin Klasse G
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
KOF	Körperoberfläche
LB	Luria broth
M	mean (Mittelwert)
MD	median (Median)
mg	milligramm
min	Minute
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NOPHO	Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology
O.D. _{405nm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm
PBS	phosphate buffered saline (Natriumphosphatpuffer)
PEG	Polyethylene Glykol
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s.c.	subkutan
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	sodium dodecyle sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
t _{1/2}	Halbwertszeit
U/l	units per liter
vs.	versus
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

ZUSAMMENFASSUNG

L-Asparaginase wird seit mehr als etwa 30 Jahren in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie sowie einiger Non-Hodgkin-Lymphome im Kindes- und Erwachsenenalter eingesetzt.

Die zytotoxische Wirksamkeit des Enzyms beruht auf der Depletion der L-Asparagin-Serumkonzentration durch Hydrolyse der Aminosäure L-Asparagin in L-Asparaginsäure und Ammoniak. Durch die fehlende Möglichkeit der Tumorzellen ausreichend L-Asparagin zu synthetisieren, kommt es zu einer Beeinträchtigung des Tumorzellstoffwechsels und schließlich zum Zelluntergang.

Aufgrund der bakteriellen Herkunft sind immunologische Reaktionen häufige Nebenwirkungen einer Therapie mit L-Asparaginase. Die Formation von spezifischen Antikörpern nach Sensibilisierung durch das Protein manifestiert sich klinisch in unterschiedlicher Ausprägung. Bis zu 30% der Patienten erleiden eine Hypersensitivitätsreaktion, welche von lokalen Reizerscheinungen bis hin zu einer systemischen Anaphylaxie reicht. Daneben kann es bei einigen Patienten zu einem schnellen Abfall der Enzymaktivität kommen. Infolge der fehlenden klinischen Symptomatik nennt man diesen Vorgang auch „stille Inaktivierung“. Dieses Phänomen übt entscheidenden Einfluss auf die Pharmakokinetik des Enzyms und schließlich auf den gesamten Therapieerfolg aus.

Eine Messmethode zur Bestimmung von Antikörpern gegen L-Asparaginase ist bis heute aufgrund der mangelnden Sensitivität und Spezifität in der klinischen Routine nicht eingeführt. Der Einsatz des Gesamtproteins als Antigen in den gegenwärtigen Assays führt zu Kreuzreaktionen, welche eine Aussage über zu erwartende immunologische Reaktionen erheblich einschränken. Drug-Monitoring Programme nutzen daher zur Therapiekontrolle die Messung der Enzymaktivität.

Zur Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit einer klinisch relevanten immunologischen Reaktion wurden Forschungsarbeiten mit dem Ziel der Entwicklung einer epitopspezifischen Messmethode von Antikörpern gegen L-Asparaginase gestartet. Für dieses Projekt wurden in der vorliegenden Arbeit anstatt des Gesamtproteins sechs synthetisch hergestellte Fragmente der L-Asparaginase als Antigene in einem ELISA eingesetzt. Es erfolgte ein Screening auf Antikörper-Bindung unter Verwendung der Seren von 42 pädiatrischen Patienten mit und ohne einer „stillen Inaktivierung“ aus der

NOPHO-ALL 2000 Studie, einer multizentrischen ALL-Therapiestudie für Kinder und Jugendliche in den skandinavischen Ländern.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Bindung von Antikörpern an zwei der sechs Peptide und einer „stillen Inaktivierung“ beobachtet werden. Im untersuchten Kollektiv lag für Patienten mit einer raschen Inaktivierung der Enzymaktivität (n=19) am Ende der Reinduktion eine signifikant häufigere Bindung von Antikörpern an das Fragment mit den Aminosäuresequenzen (AS) 1-136 als in der Kontrollgruppe (n=14) vor. Eine häufige, nicht signifikante Bindung konnte an das Fragment mit den AS 214-326 nachgewiesen werden. Ein signifikant höherer Anstieg der Antikörpertiter von der Induktion zur Reinduktion zeigte sich in der Gruppe der „stillen Inaktivierer“ versus der „therapeutischen Aktivität“ für das Fragment mit den AS 1-136 sowie für das L-Asparaginase-Gesamtprotein.

Die Sequenzen 1-136 und 214-326 entsprechen dem N- bzw. C-terminalen Anteil des L-Asparaginase-Moleküls und liegen im Bereich des aktiven Zentrums des Enzyms. Eine Bindung von Antikörpern an hier lokalisierten Epitopen führt möglicherweise zu einer Beeinflussung der enzymatischen Aktivität und liefert vermutlich eine Erklärung für den Vorgang der „stillen Inaktivierung“.

Patienten mit Enzymaktivität im therapeutischen Bereich (n=23) wiesen nur eine geringe Antikörperbindung auf. Kreuzreaktionen beeinträchtigten auch die Messmethode des epitopspezifischen Assays. Der Einfluss von Kreuzreaktionen bei der Messung von Antikörpertitern gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein war entgegen der Erfahrung publizierter Arbeiten nur gering.

Durch weitere prospektive Studien könnte eine Optimierung des epitopspezifischen Antikörper-Assays und der damit verbundenen Identifikation klinisch relevanter Epitope erreicht werden. Für eine Therapie mit L-Asparaginase bleibt innerhalb eines rationalen Drug-Monitorings die Messung der Enzymaktivität zunächst unersetzlich.

ABSTRACT

L-asparaginase has been an essential part in the treatment schedules of acute lymphoblastic leukemia and some non-hodgkin-lymphoms in children and adults for more than 30 years.

The cytotoxic mechanism of the enzyme is based on the depletion of L-asparagine by hydrolysis of the amino acid L-asparagine into L-aspartic acid and ammonia. The tumor cells lack sufficient amounts for themselves for synthesizing, resulting in an impairment of the protein biosynthesis and finally in cell death.

Because of the bacterial origin immunological reactions are common side effects under a therapy with L-asparaginase. The formation of specific antibodies by sensitization with the protein may become clinically manifest in different ways. Nearly 30% of the patients suffer from hypersensitivity reactions, which presents themselves in a wide spectrum from local irritations to systemic anaphylaxis. In addition some patients will develop a faster decrease of the enzymatic activity. Due to the absence of clinical symptoms this phenomenon is called "silent inactivation". This process influences the pharmacokinetic and finally the therapeutic outcome significantly.

Currently a determination method of antibodies against L-asparaginase is not available in clinical practice. The use of the complete L-asparaginase protein results in cross reactions, which limit the information about the appearance of a relevant immunological reaction. Because of its low specificity and sensitivity of the assays drug-monitoring programs measure the enzymatic activity for therapy control.

For improvement of the prediction of hypersensitivity reactions and "silent inactivation" a project was started with the aim of developing an epitope-specific assay for the detection of L-asparaginase antibodies. In the present study six synthetic peptides of L-asparaginase were used as antigens in ELISA instead of the complete protein. A screening for antibodies binding was performed by using sera of 42 patients with and without "silent inactivation", which were kindly made available by the NOPHO-ALL 2000 group, a study group for the treatment of ALL in children in Scandinavian countries.

A correlation between the binding of specific antibodies against two of the six peptides and a “silent inactivation” could be observed. In the studied collective patients with a fast decrease of the enzyme activity (n=19) had a significantly more frequent binding of antibodies to the fragment with amino acids 1-136 than the control group (n=14) at the end of reinduction. A frequent, but not significantly binding to the fragment with amino acids 214-326 could be demonstrated. A significant higher increase of antibody titers from induction to reinduction was shown for the “silent inactivation” group versus the “therapeutic activity” for the fragment with amino acids 1-136 and the complete L-asparaginase protein.

The amino acids 1-136 and 214-326 correspond to the N- and C-terminal part of the L-asparaginase molecule and are situated near the active center of the enzyme. A binding of antibodies may affect the enzymatic activity and may provide us with an explanation for the action of “silent inactivation”.

Patients with an enzyme activity in a therapeutic range (n=23) showed only a marginal binding of antibodies. Cross reactions also impaired the method of the epitop-specific assay. The influence of cross reactions by antibodies measurement to the complete L-asparaginase protein was less than in other published works.

By conducting more prospective studies an optimization of an epitope-specific assay and the detection of clinically relevant epitopes could be achieved. In the setting of a rational drug monitoring of L-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia the measurement of the enzyme activity is at first irreplaceable.

EINLEITUNG

1.1 Überblick

L-Asparaginase ist seit mehr als etwa 30 Jahren essentieller Bestandteil in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) sowie einiger Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Der Einsatz in einer Kombination von unterschiedlichen Zytostatika führt zu Heilungsraten von über 80% bei pädiatrischen ALL-Patienten [68]. Die klinische Wirksamkeit beruht dabei auf der Depletion von L-Asparagin im Serum durch Hydrolyse von L-Asparagin zu L-Asparaginsäure und Ammoniak. Durch die fehlende Möglichkeit der Tumorzellen, die nicht-essentielle Aminosäure L-Asparagin in ausreichendem Maße selbst zu synthetisieren, kommt es zu einer Beeinträchtigung der Zellfunktionen und schließlich zum Zelltod [12,76].

Alle klinisch eingesetzten L-Asparaginasen sind bakteriellen Ursprungs mit eingeschränkter Kreuzimmunogenität und führen neben ihren toxischen Nebenwirkungen, welche insbesondere die Leber, das Pankreas und das Gerinnungssystem betreffen, häufig zu immunologischen Reaktionen [56]. Klinische Hypersensitivitätsreaktionen reichen dabei von milden Erythemen bis hin zu einer schweren systemischen Anaphylaxie [13]. Zusätzlich zeigen einige Patienten einen schnellen Abfall der L-Asparaginase-Aktivität im Serum ohne klinische Symptomatik, auch „stille Inaktivierung“ genannt [7]. Der rasche Abfall der Enzymaktivität ist ein wichtiger Mechanismus in der Resistenzentwicklung gegen das Medikament und hat bedeutenden Einfluss auf den Therapieerfolg [50,65].

Beide Formen der immunologischen Reaktionen auf die L-Asparaginase-Gabe sind auf die Bildung spezifischer Antikörper zurückzuführen, welche der Subklasse G zuzuordnen sind [22,47]. Ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Antikörpern, klinischer Hypersensitivitätsreaktionen und schneller Enzyminaktivierung ist in der Literatur beschrieben worden [7,43,89].

Da die Vorhersage von klinischen Reaktionen und die vorzeitige Erkennung des rapiden Abfalls der L-Asparaginase-Aktivität von enormer Wichtigkeit in der Behandlung des Patienten ist, wurden Assays zur Bestimmung von L-Asparaginase-Antikörpern entwickelt [84]. Alle bisher publizierten Methoden sind jedoch weder sensitiv noch spezifisch genug, um in der klinischen Routine eingesetzt zu werden [85,88]. Das Problem der vorhandenen Assays sind Kreuzreaktionen zwischen dem L-Asparaginase-Protein und Antikörpern, die wahrscheinlich gegen andere Proteine gerichtet

sind. Untersuchungen belegen die Messung von Antikörpern gegen L-Asparaginase bei Personen, die niemals zuvor mit L-Asparaginase in Kontakt gekommen waren [6,64]. Diese Kreuzreaktionen beeinträchtigen in erheblichem Maße die Aussagefähigkeit der Antikörper-Assays und machen sie für den Einsatz in der Patientenversorgung unbrauchbar. Um eine suffiziente therapeutische Aktivität der L-Asparaginase dennoch zu gewährleisten, wird ein Drug-Monitoring durch Messung der Enzymaktivität durchgeführt, welches mit häufigen und gerade in der pädiatrischen Hämatonkologie für die Patienten belastenden Blutentnahmen verbunden ist.

Zur Verbesserung der prognostischen Aussagekraft eines Antikörper-Assays wurde in der Marburger Arbeitsgruppe versucht, einen epitopspezifischen Assay aufzubauen. Dabei sollte die Antikörpersuche auf klinisch relevante Epitope reduziert und damit Kreuzreaktionen weitestgehend ausgeschlossen werden. In Vorarbeiten konnte die Durchführbarkeit an Patientenseren durch willkürlich geschnittene Fragmente des L-Asparaginase-Proteins bewiesen werden. Die weitere Spezifizierung der Fragmente durch Identifizierung potentiell klinisch relevanter Epitope wurde zunächst theoretisch durch ein Computer-Strukturmodell, später experimentell durch „Phage-Display“ und die „SPOTs“-Methode durchgeführt. Die Resultate des experimentellen Epitop-Mappings mit der Identifikation von B-Zell-Epitopen dienten als Grundlage für die Auswahl von Teilsequenzen der L-Asparaginase [87]. Diese wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert und als Antigene in einem ELISA verwendet. Unter Einsatz von Patientenseren aus der ALL 2000 Studie der Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO), einer multizentrischen Studiengruppe zur Behandlung der pädiatrischen ALL in skandinavischen Ländern, wurden die Proteine auf Antikörperbindung untersucht.

Im Mittelpunkt dieser Untersuchung steht die Optimierung einer spezifischen und sensitiven Methode zum Nachweis von Antikörpern gegen das L-Asparaginase-Protein. Mit der Entwicklung eines epitopspezifischen Antikörper-Assays soll der therapeutische Einsatz der L-Asparaginase verbessert werden. Die Information über den immunologischen Status des Patienten könnte die Grundlage für eine weitere Therapieplanung bilden, um klinische Reaktionen oder eine „stille Inaktivierung“ frühzeitig zu erkennen und durch einen Wechsel des L-Asparaginase-Präparats möglicherweise zu vermeiden. Der Therapieerfolg wäre dadurch maßgeblich beeinflussbar.

1.2 Historische Entwicklung

Der Einzug der L-Asparaginase in die Behandlung maligner Lymphome begann 1953 mit der Beobachtung von Kidd et al., dass durch Meerschweinchenserum das Tumorstadium bestimmter Lymphome in Ratten und Mäusen beeinflusst wurde. Die alleinige Gabe von Meerschweinchenserum war ausreichend, um eine Regression der Lymphome zu erreichen, während durch die Gabe von Kaninchen- oder Pferdeserum derartige Effekte nicht erzielt werden konnten [41]. Diese tumorinhibierende Wirkung wurde zunächst den im Serum enthaltenen Komplementfaktoren zugesprochen [42].

Broome et al. konnten später beweisen, dass nicht die Komplementfaktoren, sondern das Enzym L-Asparaginase für die Tumorregression verantwortlich war [16,17]. Dabei stützten sie sich auf Untersuchungen von Clementi, der bereits 1922 festgestellt hatte, dass Meerschweinchenserum im Gegensatz zu anderen Tierarten einen hohen Gehalt an L-Asparaginase aufweist [24]. Broomes Ergebnisse wurden schließlich von Yellin und Wriston bekräftigt, die in ihren Versuchen die tumorinhibierende Eigenschaft der L-Asparaginase belegten [91].

Die Identifikation anderer L-Asparaginase-Quellen gelang Mashburn und Wriston 1964 mit der Isolierung des Enzyms aus *Escherichia coli* [53]. Durch diese Entdeckung wurde es möglich, größere Mengen für den präklinischen und klinischen Gebrauch zu gewinnen. Auf der Suche nach weiteren biologischen Quellen fand Wade 1968 eine hohe L-Asparaginase-Aktivität auch in *Erwinia carotovora*, später in *Erwinia chrysanthemi* umbenannt [82]. Daneben besitzen auch *Serratia marcescens* und *Wolinella succinogenes* relevante L-Asparaginasen [56,82]. In anderen bakteriellen Mikroorganismen wie *Bacillus coagulans* und *Pseudomonas*-Spezies konnten L-Asparaginasen mit keiner oder nur geringer antineoplastischer Aktivität nachgewiesen werden [53,83].

Eingang in den klinischen Gebrauch fanden lediglich aus *E. coli* und *Erwinia chrysanthemi* isolierte L-Asparaginasen. Neben den nativen Formen wurde in den 1980er Jahren eine mit Polyethylenglykol konjugierte *E. coli* L-Asparaginase (PEG-Asparaginase) entwickelt.

Heutzutage stellen die aus *E. coli* und *Erwinia chrysanthemi* isolierte sowie PEG-Asparaginase einen etablierten Bestandteil in den Therapieprotokollen der akuten lymphatischen Leukämie und einiger Non-Hodgkin-Lymphome im Kindes- und Erwachsenenalter dar.

1.3 Biochemische Eigenschaften

L-Asparaginase (L-Asparagin Amidohydrolase EC 3.5.1.1) wird im Stoffwechsel zahlreicher Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen gefunden [2]. Von Interesse sind jedoch nur die Enzyme aus *E. coli* und *Erwinia chrysanthemi*, die eine nutzbare antineoplastische Aktivität aufweisen und in für den klinischen Einsatz ausreichender Menge hergestellt werden können [2,53,83]. Tatsächlich besitzt auch *E. coli* zwei Enzyme, EC-1 und EC-2, mit unterschiedlicher Lokalisation in der Zelle. EC-1, zytosolisch und EC-2, periplasmatisch vorkommend, haben eine stark unterschiedliche Substrataffinität, von denen lediglich das Isoenzym EC-2 ausreichende zytostatische Wirksamkeit zeigt [19,48].

Die native *E. coli* L-Asparaginase hat ein Molekulargewicht von ca. 141.000 Dalton (Da), *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase von ca. 138.000 Da [60]. Beide Enzyme weisen eine niedrige Michaelis-Menten-Konstante K_m für L-Asparagin von 10 $\mu\text{mol/l}$ (*E. coli*) und 12 $\mu\text{mol/l}$ (*Erwinia chrysanthemi*) auf [56]. Dies resultiert in einer hohen Substratspezifität. Hohe Konzentrationen von L-Asparaginsäure und Ammoniak hemmen die Enzymaktivität nicht. Neben der Hydrolyse von L-Asparagin wird auch L-Glutamin durch das Enzym gespalten, jedoch ist die Affinität bei einer 100-fach höheren K_m wesentlich geringer [56]. Dennoch können hohe Dosen von L-Asparaginase zu einer Depletion von L-Glutamin im Serum führen [54]. Die Höhe der L-Glutaminase-Aktivität liegt bei 2-5% der L-Asparaginase-Aktivität; *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase weist dabei mit ca. 10% eine höhere Aktivität gegenüber L-Glutamin auf [54,60,90].

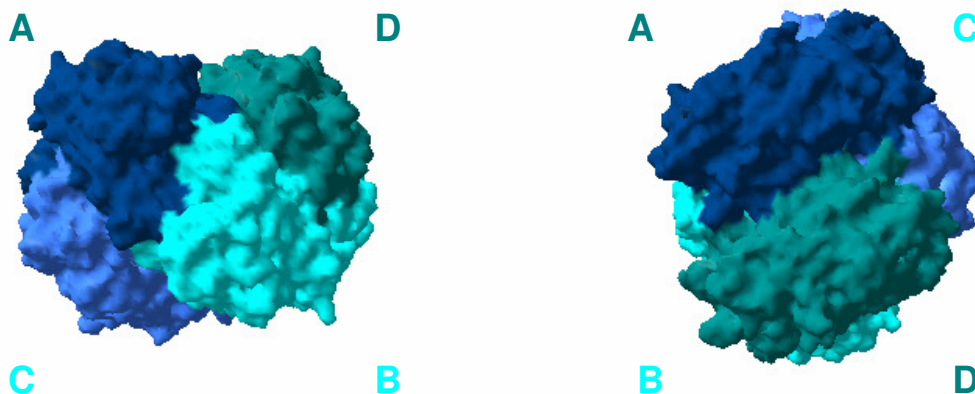


Abb. 1: Strukturmodell der *E. coli* L-Asparaginase. Dargestellt sind die vier identischen Unter-einheiten A (dunkelblau), C (hellblau), B (hellgrün) und D (dunkelgrün)

Das molekulare Strukturmodell der *E. coli* L-Asparaginase zeigt Abbildung 1. Das Enzym besteht als Tetramer aus vier identischen Untereinheiten A, B, C und D mit je einem aktiven Zentrum. Dabei entspricht das Tetramer einem Dimer aus identischen Dimeren, die sich zwischen zwei Untereinheiten (zwischen A und B sowie zwischen C und D) ausbilden. Die vier aktiven Zentren liegen jeweils zwischen der N-terminalen Domäne der einen und der C-terminalen Domäne der anderen Untereinheit [78].

Das Molekulargewicht der PEG-konjugierten L-Asparaginase ist nur unwesentlich höher als das der nativen Formen und liegt bei ca. 145.000 Da. In ihren weiteren biochemischen Eigenschaften ähnelt sie der nativen *E. coli*-Form.

1.4 Pharmakodynamik

L-Asparaginase katalysiert die Hydrolyse von L-Asparagin zu L-Asparaginsäure und Ammoniak. Dieser Vorgang führt zu einem Abfall der L-Asparagin-Konzentration im Serum. Über diese Depletion wirkt das Enzym indirekt zytotoxisch auf sensible maligne lymphatische Zellen, die auf eine exogene Zufuhr der Aminosäure angewiesen sind.

Auch L-Glutamin wird von L-Asparaginasen gespalten, jedoch ist die Affinität gegenüber dieser Aminosäure wesentlich niedriger. In Abbildung 2 ist die Hydrolyse schematisch dargestellt.

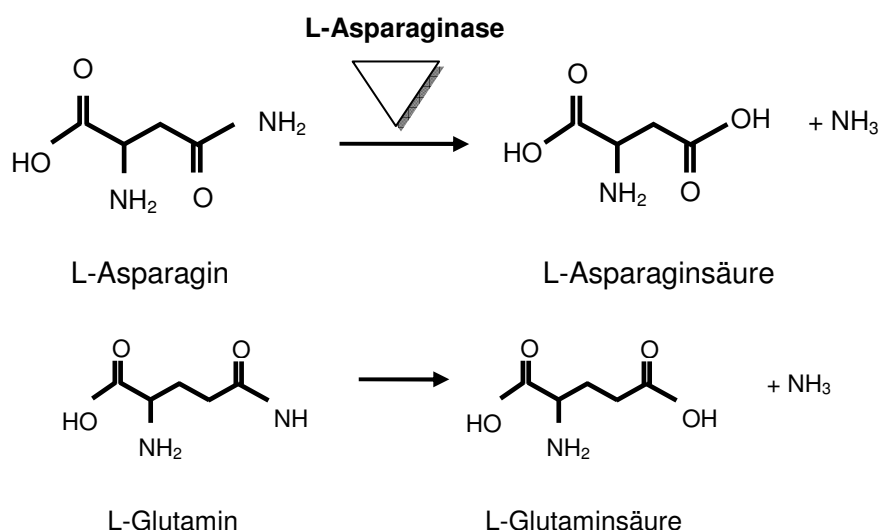


Abb. 2: Hydrolyse von L-Asparagin und L-Glutamin durch L-Asparaginase

Jede Körperzelle verfügt über das Enzym L-Asparagin-Synthetase (ASY), welches unter Mangel von L-Asparagin eine ausreichende Eigensynthese gewährleistet [34]. Die Synthese erfolgt aus L-Asparaginsäure und L-Glutamin als Aminogruppendonor, wie in Abbildung 3 ersichtlich ist.

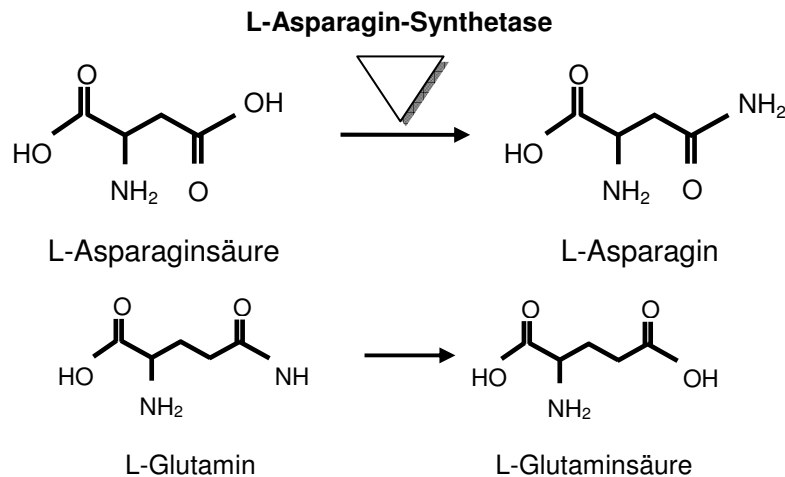


Abb. 3: Aktivität der L-Asparagin-Synthetase

Maligne lymphatische Zellen, die sensibel auf eine Behandlung mit L-Asparaginase ansprechen, produzieren L-Asparagin aufgrund ihrer niedrigen Basisexpression des ASY-Gens nur in geringen Mengen [34,86]. Unter L-Asparagin-Mangel besitzen sie keine Möglichkeit, ihre ASY-Aktivität ausreichend zu steigern. Die Höhe der L-Asparagin-Konzentration im Serum liegt unter physiologischen Bedingungen konstant in einem Bereich zwischen 40-80 $\mu\text{mol/l}$ [15]. Ein Abfall der Konzentration darunter kann durch die neoplastisch veränderten Zellen nicht kompensiert werden [90]. Sie sind auf eine extrazelluläre Zufuhr angewiesen. Es folgt eine Beeinträchtigung der Proteinsynthese durch Inhibition von RNA- und DNA-Synthese und schließlich der Zelltod [12,76]. Es kommt zum Verharren der Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus und der Induktion von Apoptosevorgängen [79].

Der Wirkmechanismus der L-Asparaginase ist in Abbildung 4 in einem Übersichtsschema dargestellt.

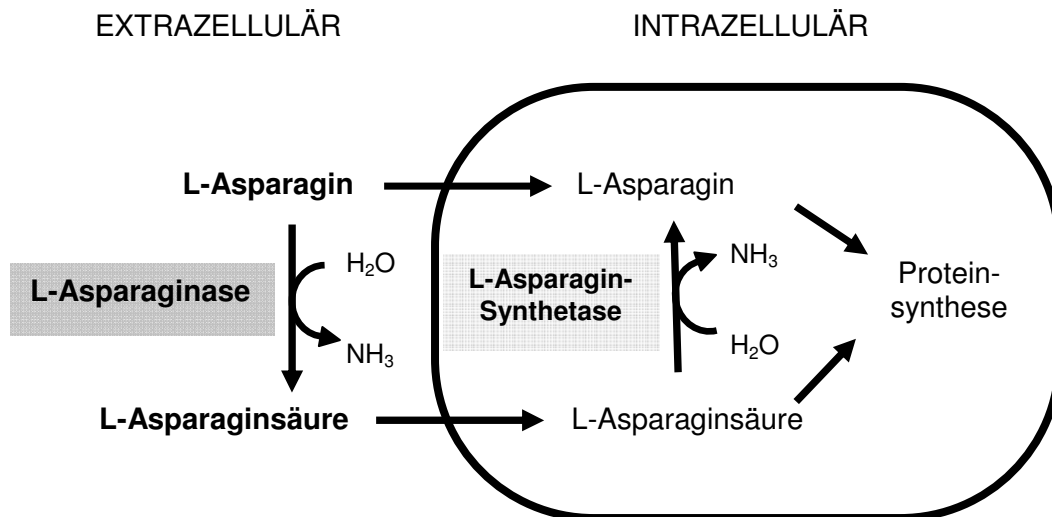


Abb. 4: Wirkmechanismus von L-Asparaginase (modifiziert aus Mueller et al. [56])

Der Mechanismus einer Resistenzentwicklung gegenüber L-Asparaginase wurde lange einer Hochregulation der L-Asparagin-Synthetase-Aktivität in den malignen Blasten zugesprochen. Studien zeigten eine Kompensation des L-Asparagin-Mangels durch Eigensynthese aufgrund einer erhöhten ASY-Aktivität [34,60]. Zahlreiche Autoren unterstützen diese Aussagen nicht mehr. Appel et al. konnten zeigen, dass die Höhe der ASY-Aktivität in den malignen Zellen in keinem Zusammenhang mit einem klinisch schlechteren Ansprechen auf eine L-Asparaginase-Gabe steht [5]. Auch Stams et al. beobachteten für eine Subgruppe der ALL-Patienten keine Korrelation zwischen der Höhe der ASY-Expression und einer Resistenz gegenüber L-Asparaginase [77].

Mit ihren Untersuchungen lieferten Iwamoto et al. die Basis für ein neues Verständnis der Ursache einer L-Asparaginase-Resistenz in der ALL-Therapie. Mesenchymale Zellen des Knochenmarks weisen eine hohe ASY-Aktivität mit kontinuierlicher Sekretion von L-Asparagin auf. In Zellverbänden mit den malignen Blasten ermöglichen sie einen Schutz vor der zytotoxischen Wirkung von L-Asparaginase und führen zu einer Resistenz der leukämischen Blasten gegenüber der Medikamentengabe [37].

Ein weiterer Grund für die Medikamentenresistenz wird in der Bildung von spezifischen Antikörpern gesehen, welche zu einer beschleunigten Inaktivierung des Enzyms führen und damit die Pharmakokinetik entscheidend beeinflussen können [7,8].

1.5 Pharmakokinetik

Im therapeutischen Einsatz wird L-Asparaginase über den intravenösen (i.v.) oder intramuskulären (i.m.) Weg appliziert. In einigen Ländern erfolgt die Gabe auch subkutan (s.c.) Eine orale Gabe ist aufgrund fehlender gastrointestinaler Absorption nicht möglich. Gegenwärtig wird das Enzym in den meisten Studienprotokollen intravenös verabreicht. Ein Vergleich zwischen i.m.- und i.v.-Gabe im Hinblick auf die therapeutische Effizienz zeigte keinen Unterschied. Die i.m.-Applikation ist jedoch mit einer geringeren Inzidenz klinischer Hypersensitivitätsreaktionen verbunden [61].

Alle L-Asparaginase-Präparate weichen deutlich in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften voneinander ab. Tabelle 1 zeigt die differierenden Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der verschiedenen Präparate nach intravenöser Gabe einer Dosis von 25.000 U/m² *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase, 10.000 U/m² *E. coli* L-Asparaginase und 500-8.000 U/m² PEG-Asparaginase.

	<i>Erwinia chrysanthemi</i> L-Asparaginase	<i>Escherichia coli</i> L-Asparaginase	PEG- Asparaginase
Halbwertszeit $t_{1/2}$ (Tage \pm SD)	0,26 (\pm 0,20)	0,29 – 1,17	14,88 (\pm 10,13)

Tabelle 1: Pharmakokinetische Eigenschaften der verschiedenen L-Asparaginase-Präparate nach i.v.-Administration (aus Albertsen et al. [44], Ho et al.[35,36])

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ nach intramuskulärer Administration von 25.000 U/m² *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase ist statistisch signifikant kürzer als diejenige nach Gabe von 25.000 U/m² *E. coli* L-Asparaginase. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 2.500 U/m² PEG-Asparaginase ist gegenüber *E. coli* L-Asparaginase statistisch signifikant länger. Die Halbwertszeiten sowie die sich daraus ergebenden unterschiedlichen Zeitintervalle der L-Asparagin-Depletion im Serum sind in Tabelle 2 demonstriert.

	<i>Erwinia chrysanthemi</i> L-Asparaginase	<i>Escherichia coli</i> L-Asparaginase	PEG- Asparaginase
Halbwertszeit $t_{1/2}$ (Tage \pm SD)	0,65 (\pm 0,13)	1,28 (\pm 0,35)	5,73 (\pm 3,24)
L-Asparagin-Depletion (Tage)	7-15	14-23	26-34

Tabelle 2: Pharmakokinetische Eigenschaften der verschiedenen L-Asparaginase-Präparate nach i.m.-Administration (aus Asselin et al. [8])

Eine Erhöhung der Dosis führt zu keiner Verlängerung des Zeitintervalls mit Enzymaktivität im therapeutischen Bereich. Dies kann nur durch wiederholte Applikationen erreicht werden [59].

Neben den klassischen Variablen wird die Pharmakokinetik vor allem durch immunologische Reaktionen mit der Bildung von Antikörpern entscheidend beeinflusst. Asselin et al. konnten für Patienten mit klinischer Hypersensitivitätsreaktion nach i.m.-Gabe von 25.000 U/m² *E. coli* L-Asparaginase oder 2.500 U/m² PEG-Asparaginase einen signifikanten Abfall der Serumhalbwertszeit $t_{1/2}$ in den nicht messbaren Bereich (*E. coli*) und auf $1,82 \pm 0,3$ Tagen (PEG) bestimmen. Hohe Titer von L-Asparaginase-Antikörpern korrelierten mit dem Abfall der $t_{1/2}$ sowie der Dauer der L-Asparagin-Depletion im Serum [8].

Der Metabolismus und die Elimination des L-Asparaginase-Proteins sind bisher nicht eindeutig geklärt. Man vermutet den Abbau über das retikulendotheliale System (RES) [18]. Einige Untersucher erklären den Abbau von *E. coli* L-Asparaginase durch eine Kinetik 1. Ordnung [7]. Demgegenüber konnte für die PEG-Asparaginase eine Abnahme der Enzymaktivität entsprechend der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden [57]; diese Ergebnisse lassen auch für die nativen Formen eine Abnahme der gemessenen Serumaktivität durch eine nicht-lineare Kinetik vermuten.

Riccardi et al. zeigten erstmals in ihren Untersuchungen, dass L-Asparaginase-Aktivitäten im Plasma ≥ 100 U/l ausreichend sind, um eine vollständige L-Asparagin-Depletion im Serum und im Liquor cerebrospinalis zu bewirken [70]. Weitere Studien bekräftigen die Ergebnisse, weisen aber darauf hin, dass auch mit Enzymaktivitäten unter 100 U/l eine vollständige L-Asparagin-Depletion bei der Mehrzahl der Patienten zu erreichen ist [3,4,15,71].

Gegenwärtig wird im klinischen Alltag ein Wert ≥ 100 U/l als untere Grenze therapeutischer Aktivität angesehen und eine vollständige L-Asparagin-Depletion über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen angestrebt [56].

1.6 Präparate

L-Asparinasen, die für den klinischen Gebrauch zugelassen sind, werden aus bakteriellen Mikroorganismen gewonnen. Neben der nativen Form aus *Escherichia coli* steht eine mit monovalentem Polyethylenglykol konjugierte *E. coli* L-Asparinase (PEG-Asparinase) zur Verfügung. Eine aus *Erwinia chrysanthemi* isolierte L-Asparinase ist, nach kurzzeitiger Nichtverfügbarkeit, gegenwärtig wieder auf dem Markt erhältlich.

In den USA wird die native Form unter Elspar® (Merck), die pegylierte Form unter Oncaspar® (Enzon) vertrieben. In Europa und Asien ist die native Form als Asparinase Medac (Medac) und pegyliert als Oncaspar® (Medac) erhältlich. Beide werden jedoch aus einem anderen *E. coli*-Stamm isoliert und besitzen andere pharmakokinetische Eigenschaften. Die aus *Erwinia chrysanthemi* isolierte L-Asparinase ist unter dem Markennamen Erwinase® (Eusa Pharma) verfügbar. Weitere Handelspräparate im klinischen Gebrauch sind Kidrolase® (Rhône-Poulenc Rorer) in Kanada und Leunase® (Aventis) in Australien.

Die Modifikation der *E. coli* L-Asparinase durch kovalente Bindung von Polyethylenglykolmolekülen resultiert in einer Verlängerung der Serumhalbwertszeit der Enzymaktivität [7,9]. Das veränderte pharmakokinetische Profil ermöglicht die Gabe in niedrigerer Dosis und verlängerten Applikationsintervallen. Durch eine ein-, maximal zweimalige Gabe wird eine Serumaktivität im therapeutisch wirksamen Bereich über etwa drei Wochen erreicht [33]. Dies bedeutet gerade für den Einsatz in der pädiatrischen Hämatonkologie eine geringere Belastung für den Patienten.

Eine Reduktion der Immunogenität ist mit Veränderung der Molekülstruktur nicht erreicht worden [66]. Obwohl klinische Reaktionen weniger häufig gesehen werden, steigt die Inzidenz bei bereits unter *E. coli* L-Asparinase reagierenden Patienten auf ca. 30% an [72,85]. Als vorherrschende immunologische Reaktion auf eine PEG-Asparinase-Gabe kann häufig eine vorzeitige Enzyminaktivierung beobachtet werden [57].

Obwohl alle drei Präparate den identischen pharmakodynamischen Mechanismus sowie ein ähnliches Toxizitätsprofil besitzen, unterscheiden sie sich in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften. Bei einer Umstellung oder einem Austausch der Präparate im Behandlungsprotokoll muss daher eine Anpassung von Dosierung und Zeitintervall

zwischen den Gaben beachtet werden. Andernfalls kann ein suffizienter Therapieerfolg nicht gewährleistet werden [15,56].

Während *E. coli* L-Asparaginase in den meisten Behandlungsprotokollen als „front-line“ Medikament eingesetzt wird, ist PEG-Asparaginase als Ausweichpräparat nach immunologischer Reaktion im Einsatz. Die klinische Wirksamkeit von PEG-Asparaginase wurde in zahlreichen Studien belegt [33]. Durch die signifikant längere Halbwertszeit wird die Applikationsfrequenz während eines Therapieblocks deutlich gesenkt [33]. Trotz einer geringeren Gesamtdosis kann nach Gabe von PEG-Asparaginase im Mittel eine höhere Serumaktivität als nach Gabe der nativen Form beobachtet werden [6]. Der Einsatz von PEG-Asparaginase als „front-line“ Medikament zeigt im Vergleich zum *E. coli*-Präparat keinen signifikanten Unterschied in den Gesamtüberlebensraten. Ein eindeutiger Vorteil eines Präparats ist bisher nicht beschrieben worden [9,33,57,60,71]. Für Patienten im ersten Rezidiv der ALL konnten Abshire et al. in einer randomisierten Studie die Überlegenheit einer wöchentlichen statt zweiwöchentlichen Gabe von PEG-Asparaginase beobachten. Höhere L-Asparaginase-Aktivitäten korrelierten mit einer höheren Ansprechrate [1].

Mit einer großen randomisierten Studie der „European Organisation for Research and Treatment of Cancer - Children's Leukemia Group“ (EORTC-CLG) konnten Duval et al. deutlich das Gewicht der unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften von L-Asparaginase-Präparaten demonstrieren. In beiden Therapiearmen erfolgte jeweils in Induktion und Reinduktion die Behandlung mit *E. coli* oder *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase in gleicher Dosierung und Applikationsintervall. Die Gesamtüberlebensrate lag nach sechs Jahren unter *E. coli* L-Asparaginase bei 83,9% und unter *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase bei 75,1% [26]. Die Studienergebnisse zeigen klar den Einfluss einer fehlenden Berücksichtigung der pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften der L-Asparaginasen auf den Behandlungserfolg.

Neben der Modifikation und Herstellung von PEG-Asparaginase wurden weitere Versuche zur Reduktion der Immunogenität der verfügbaren Präparate von verschiedenen Gruppen unternommen. In tierexperimentellen Studien zeigte der Einschluss von L-Asparaginase in Liposomen eine verlängerte Halbwertszeit, eine geringere Bildung von Antikörpern und verringerte Wahrscheinlichkeit von Hypersensitivitätsreaktionen [32]. Eine Koppelung von L-Asparaginase an Dextran konnte das immunogene Toxizitätspotential nur gering reduzieren [60]. Die Polysialisierung von *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase führte zu einer Reduktion der Antikörperantwort nach

Immunisierung von Mäusen. Zudem wurde durch die Konjugation die Halbwertszeit verlängert [31]. Moola et al. konnten mittels synthetischem Hexapeptid-Scan 10 B-Zell-Epitope der *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase identifizieren. Der Austausch von Aminosäuren durch „site-directed mutagenesis“ führte zu einer Reduktion der Antigenität des veränderten Enzyms gegenüber der nativen Form [55]. Eine Molekülmodifikation erreichten auch Chen et al. durch „alanine scanning mutagenesis“ (Alaninaustausch) eines stark antigenen Epitops der *E. coli* L-Asparaginase. Das mutierte Enzym zeigte im ELISA mit polyklonalen Antikörpern gegen L-Asparaginase vom Kaninchen eine deutliche Reduktion der Antigenität gegenüber dem Wildtyp [21].

Der Einfluss der modifizierten oder mutagenen Enzyme auf die Pharmakokinetik und -dynamik ist bisher nur tierexperimentell beobachtet worden. Ziele der künftigen Untersuchungen müssen die Bestätigung der reduzierten Immunogenität und Antitumoraktivität in vivo sein.

1.7 Klinischer Stellenwert

L-Asparaginase findet ihren Einsatz vorrangig in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie im Kindes- und Erwachsenenalter sowie einiger Non-Hodgkin-Lymphome.

Obwohl in den Anfangsjahren die Erwartungen an das Enzym für den Einsatz in der Therapie weiterer Tumorerkrankungen sehr hoch waren, zeichnete sich eine relevante klinische Wirksamkeit lediglich bei der ALL und den Lymphomen ab. Arbeiten über eine zytostatische Aktivität in akuten und chronisch myeloischen sowie chronisch lymphatischen Leukämien oder anderen soliden Lymphomen sind nur in geringer Anzahl publiziert wurden [23,11].

L-Asparaginase ist seit etwa 30 Jahren ein etablierter Bestandteil in den Therapieprotokollen der ALL. Der Einsatz erfolgt vorrangig (insbesondere in den USA auch in der Konsolidations-/Erhaltungsphase) innerhalb der Induktions- und Reinduktionsphase.

Zahlreiche klinische Studien bestätigten bereits in den ersten Jahren die Wirksamkeit einer L-Asparaginase-Therapie [56]. Die therapeutische Effizienz führte zu der festen Aufnahme in die Induktionsprotokolle. In der Kombination mit weiteren Chemotherapeutika werden gegenwärtig in der Induktionsbehandlung initiale Remissionsraten von 97-99% erreicht [68]. Weitere klinische Studien demonstrieren die Bedeutung des

Einsatzes der L-Asparaginase in Induktion sowie Reinduktion der Kombinationschemotherapie der ALL [26,73]. Durch Aufnahme der L-Asparaginase in die Behandlungsprotokolle und die kontinuierliche Modifikation der übrigen Chemotherapeutika konnten die Überlebensraten von ALL-Patienten in den letzten Jahrzehnten drastisch verbessert werden. 5-Jahres-Überlebensraten für alle pädiatrischen Patienten liegen gegenwärtig bei nahezu 80% und lassen für die Zukunft einen weiteren Anstieg erahnen [68]. Entgegen der hohen Heilungsraten für Kinder liegen die Gesamtüberlebensraten für Erwachsene nur zwischen 30 und 40% [68].

Die stetige Verbesserung der Überlebensraten für Kinder mit diagnostizierter ALL während der letzten Jahrzehnte wird beispielhaft in den Zahlen der Behandlungsprotokolle der BFM-Studiengruppe deutlich: ALL-BFM 83 ($64\% \pm 2\%$), ALL-BFM 86 ($72\% \pm 1\%$), ALL-BFM 90 ($78\% \pm 1\%$) und ALL-BFM 95 ($79\% \pm 1\%$) (6-Jahres-Ereignisfreie-Überlebensraten für das gesamte Patientenkollektiv) [75].

Abbildung 5 zeigt einen internationalen Überblick der 5-Jahres-Überlebensraten von acht großen Studiengruppen für Kinder mit diagnostizierter ALL in den 90er Jahren. Diese liegen in einem Bereich zwischen 70 und 80% für alle behandelten Kinder. Ein direkter Vergleich ist aufgrund der unterschiedlichen Einschlusskriterien jedoch nicht möglich.

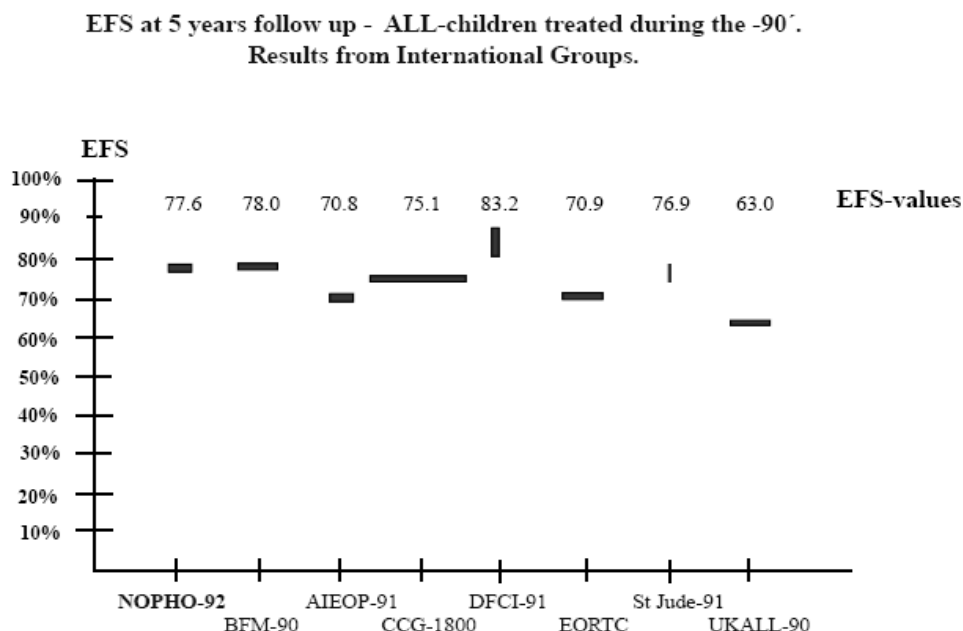


Abb. 5: 5-Jahres Überlebensraten für Kinder mit diagnostizierter und behandelter ALL in den 90er Jahren von acht internationalen Studiengruppen (NOPHO (Anzahl der Studienpatienten, n=1.143), BFM (n=2.178), AIEOP (n=1.194), CCG (n=5.121), DFCI (n=377), EORTC (n=2.065), St. Jude (n=165), UKALL (2.090) (aus Treatment Protocol NOPHO-ALL 2000)

Trotz der sich stetig verbessernden Prognose bei Erstdiagnose stellen Rezidive bei etwa 20% der Kinder das Hauptproblem in der Behandlung der ALL dar [75]. Neben einer ständigen Verbesserung der ereignisfreien Überlebensraten werden daher zukünftige Ziele der klinischen Forschung eine Optimierung der therapeutischen Regimes für Rezidivpatienten sein.

1.8 Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie

Die akuten Leukämien gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen des Kindesalters. Sie stellen nahezu 30% aller malignen Neoplasien dar. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist dabei etwa fünfmal häufiger als die akute myeloische Leukämie (AML). Sie manifestiert sich hauptsächlich im zweiten bis fünften Lebensjahr mit leichtem Überwiegen des männlichen Geschlechts.

Die Behandlung der ALL erfolgt in den Ländern der Industriestaaten nach Behandlungsprotokollen von Studiengruppen. Dies ermöglicht die Etablierung einer Polychemotherapie zur Optimierung der ereignisfreien Überlebenszeiten bei gleichzeitig geringsten Toxizitäts- und Nebenwirkungsraten. In Deutschland, Österreich und der Schweiz gibt die ALL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster)-Studiengruppe die Therapie für Kinder und Jugendliche vor. Auf internationaler Ebene gibt es einen Zusammenschluss von Argentinien, Chile, Hong-Kong, Israel, Kroatien, Polen, Tschechische Republik, Ungarn und Uruguay zur I-BFM-SG (International BFM Study Group). Weitere Studiengruppen sind die NOPHO (Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology) in den skandinavischen Ländern, die CCG (Childrens Cancer Group) und SJCRH (St. Jude Children's Research Hospital) in den USA, die UKALL (United Kingdom ALL Study Group) in Großbritannien und die AIEOP (Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica) in Italien. Das aktuelle Studienprotokoll der NOPHO ist in Abbildung 6 dargestellt.

Nach Diagnosestellung erfolgt die Zuteilung der Patienten in Risikogruppen. Die an das individuelle Risiko adaptierte Therapie verfolgt dabei das Ziel, eine Über- oder Unterdosierung zu vermeiden, Toxizitäten gering zu halten und Rezidive durch Intensivierung zu verhindern. Die Risikostratifizierung erfolgt in den Studiengruppen anhand unterschiedlicher prognostischer Kriterien, ein universell anerkanntes Modell gibt es nicht. Die wichtigsten sind folgend aufgelistet [67,68]:

- Initiale Leukozytenzellzahl
- Alter bei Diagnosestellung
- Zytogenetische Klassifikation (Hypo- und Hyperdiploidie, Translokationen t(9;22) BCR/ABL (Philadelphia-Chromosom), t(1;19) E2A/PBX1, t(12;21) TEL/AML1, t(8;14) t(2;8) t(8;22) MYC, t(4;11) MLL/AF4, t(11;19) MLL/ENL, 14q11 TCR $\alpha\delta$ und 7q35 TCR β)
- Immunophänotypisierung (T-Zell-, Vorläufer-B-Zell-, reife B-Zell-ALL)
- Initiale Ansprechrate (morphologisch prozentualer Blastenanteil im Knochenmark an Tag 8/15 des Induktionsprotokolls)
- Morphologische Klassifikation nach French-American-British (FAB, L1-3)
- Minimal residual disease (MRD, Bestimmung des residuellen Blastenanteils im Knochenmark durch Messung mittels Durchflußzytometrie oder PCR)
- Befall des ZNS und/oder der Testes

Die meisten Behandlungsprotokolle geben eine Behandlungsdauer von zwei bis drei Jahren vor und gliedern sich in unterschiedliche Therapieabschnitte. Einer kurzen Induktionsphase folgt die Konsolidierungsphase (Intensifikation), an die sich eine lange Erhaltungstherapie anschließt.

Das Ziel der Induktion ist eine komplette Remission mit weitgehender Reduktion der Blasten im Knochenmark am Ende der Induktionsphase (< 5% Blastenanteil im Knochenmark). In den Behandlungsprotokollen der BFM- und NOPHO-Studiengruppe wird dafür eine Kombination von einem Glukokortikoid, Vincristin, L-Asparaginase, einem Anthrazyklin (Doxorubicin oder Daunorubicin) und Methotrexat eingesetzt. Die Konsolidierungsphase schließt sich mit Methotrexat und 6-Mercaptopurin, ggf. Cytarabin oder Cyclophosphamid an. Sie dient der Verhinderung eines Rezidivs und der Reduktion von residuellen Blasten. Die meisten Protokolle enthalten vor der Konsolidierung eine Reinduktionsphase. Sie besteht aus einem oder mehreren Blöcken mit wiederholten Gaben der Chemotherapeutika der Induktion. Im Anschluss folgt die Erhaltungsphase über einen Zeitraum von meist zwei Jahren oder länger, in der in der Regel eine Kombination von Methotrexat und 6-Mercaptopurin sowie einem Glukokortikoid und Vincristin verabreicht wird.

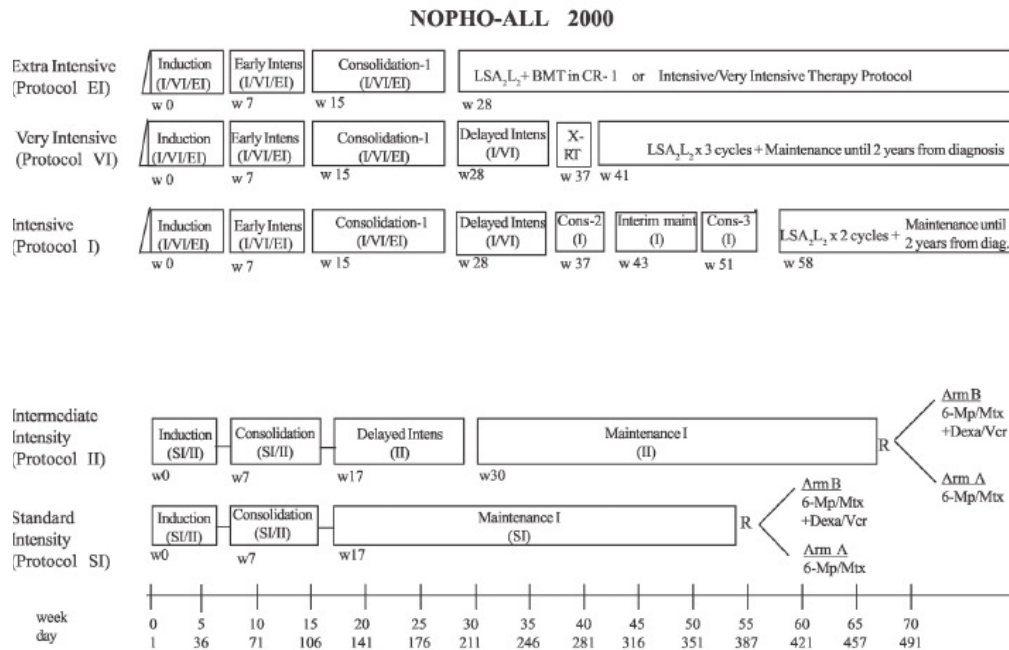


Abb. 6: Übersicht des Therapieprotokolls der ALL 2000 Studie der NOPHO (aus Treatment Protocol NOPHO-ALL 2000)

1.9 Nebenwirkungen

In der Behandlung mit L-Asparaginase müssen zwei Gruppen von unerwünschten Wirkungen unterschieden werden: toxische Effekte und immunologische Reaktionen.

Toxische Effekte auf gesundes Gewebe betreffen insbesondere die Leber, das Pankreas und das Gerinnungssystem. Mit klinischer Relevanz werden sie heute nur noch bei einer geringen Anzahl von Patienten beobachtet. Wesentlich häufiger treten dagegen immunologische Reaktionen auf. Diese manifestieren sich als leichte lokale Reizung an der Injektionsstelle bis hin zu einer schweren lebensbedrohlichen Anaphylaxie oder als schneller Abfall der Enzymaktivität ohne jedes Zeichen einer klinischen Überempfindlichkeitsreaktion.

1.9.1 Toxische Effekte

Trotz des relativ selektiven Wirkmechanismus auf den Metabolismus maligner Zellen kann es unter einer Therapie mit L-Asparaginase auch zu einer Schädigung von gesundem Gewebe kommen. Diese unerwünschten Wirkungen sind ebenfalls auf eine Beeinträchtigung der Proteinsynthese durch die L-Asparagin-Depletion zurückzuführen. Nach dem gleichen Mechanismus wie in therapiesensiblen Tumorzellen kann

ein Abfall der extrazellulären L-Asparagin-Konzentration im betroffenen gesunden Gewebe nicht kompensiert werden. Möglicherweise besitzen die Zellen aufgrund niedriger Basisexpression oder mangelnder Induzierbarkeit eine zu geringe ASY-Aktivität. Da Gewebe mit erhöhtem Proteinumsatz häufig beeinträchtigt werden, sind Leber- und Pankreastoxizität sowie Veränderungen der Gerinnung klinisch bedeutend.

Die Schwere und das Spektrum der Nebenwirkungen unter einer Therapie mit den nativen Zubereitungen sind vergleichbar mit denen, die unter der Gabe der pegylierten Form beobachtet werden [1,9]. Auch treten diese mit ähnlicher Häufigkeit auf [1,9]. Unter *E. coli* L-Asparaginase werden gegenüber *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase signifikant häufiger Veränderungen der Blutgerinnung gesehen (30,2% versus 11,8%), zudem wird ein Trend hin zu stärkerer Neurotoxizität berichtet [26]. Von einer signifikant höheren Inzidenz von Pankreatitis und Neurotoxizität unter *E. coli* L-Asparaginase wird auch in einer weiteren Studie berichtet [27]. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Pharmakokinetik ist die Toxizität beider Präparate jedoch gleich.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der verabreichten Dosis und dem Schweregrad der unerwünschten Wirkungen konnte bisher nicht bewiesen werden, jedoch treten diese unter höherer Dosierung häufiger auf [20,62].

Eine klinisch relevante Toxizität der Leber wird bei etwa 4% der Patienten beobachtet [26]. Hepatische Dysfunktionen zeigen sich mehrheitlich durch eine transiente Zunahme der Leberenzyme wie Alkalische Phosphatase, Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase sowie von Bilirubin und 5'-Nucleotidase [56,86]. Eine fettige Degeneration des Leberparenchyms wird autoptisch häufig gesehen [40,86].

Eine Beeinträchtigung des Pankreas kann sowohl die endokrine als auch die exokrine Funktion betreffen. Die Schädigung der endokrinen Funktion manifestiert sich als Störung im Glukosestoffwechsel. Einige Patienten werden durch eine Hyperglykämie symptomatisch, welche im Verlauf regredient ist und auf eine Substitution mit Insulin gut anspricht [86]. Manifestationen durch ein hyperosmolares oder ketoazidotisches Koma sind möglich [20,86]. Der Ausfall der exokrinen Pankreasfunktion tritt bei bis zu 10-16% der Patienten als akute Pankreatitis auf [60,62]. Während die Entzündung in den meisten Fällen einen milden Verlauf nimmt, kommt es bei 2-5 % der Kinder zu einer potentiell lebensbedrohlichen Situation. Nur eine geringe Anzahl der Patienten entwickelt einen Anstieg der Amylase, in den meisten Fällen liegt eine Hypoamylasämie vor [86].

Die Auswirkungen auf das Gerinnungssystem beruhen auf der Proteinsynthesestörung sowohl von Gerinnungsfaktoren als auch -inhibitoren. Es kommt zu einer Abnahme der Faktoren II, VI, VII, VIII und X, Antithrombin III, Fibrinogen, Plasminogen und Protein C [3] sowie zur Zunahme gerinnungsfördernder Proteine wie dem von Willebrand-Faktor, Prothrombinfragment 1 und 2, Plasminogen-Inhibitoraktivator 1 und Fibrinogenspaltprodukten [56]. Dieses Ungleichgewicht führt einerseits zu Blutungen und disseminierter intravasaler Gerinnung, andererseits zu Hyperkoagulabilität mit Thrombosen. Thrombembolische Ereignisse, die sich vornehmlich in den Venen des ZNS manifestieren [56], treten dabei gehäuft auf als Blutungen, was nicht zuletzt auf den thrombogenen Einfluss der Krebserkrankung selbst und den Einsatz von Glukokortikoiden in der Therapie zurückzuführen ist. Trotz der häufigen laborchemischen Veränderungen der Gerinnungsparameter ist die Inzidenz schwerer Thrombosen oder Blutungen lediglich gering.

Auswirkungen auf den Gastrointestinaltrakt, die Serumproteine und den Lipidstoffwechsel sowie eine Nephro-, Neuro- und Myelotoxizität haben einen geringen klinischen Stellenwert.

Gastrointestinale Störungen in Form von Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit sowie mildes Fieber werden bei den meisten Patienten beobachtet. In der Regel sistieren diese Störungen nach den ersten 2-5 Tagen [20,86]. Unter einer Gewichtsabnahme von mehr als 5% des Körpergewichts leiden mehr als die Hälfte der Patienten [20,86].

Beeinträchtigungen im Lipidstoffwechsel manifestieren sich als Hypo- oder Hyperlipidämie, meist fällt das Cholesterin im Serum ab [62,86].

Bei den meisten Patienten führt die Beeinträchtigung der Proteinsynthese zu einer Hypoalbuminämie [62,86].

Unerwünschte zentralnervöse Wirkungen sind Kopfschmerzen, Schwindel, Desorientiertheit, Somnolenz und Halluzinationen, die vermehrt und bei nahezu 25% der Erwachsenen auftreten können [60,62]. Bei Kindern werden häufig EEG-Veränderungen gesehen [86]. Ein Anstieg der Ammoniakkonzentration im Serum geht meist ohne neurologisches Korrelat einher [20].

Eine Beeinflussung der Nierenfunktion führt zu einer Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Serum. In den meisten Fällen wird keine Einschränkung der renalen Funktion beobachtet [20].

Im Unterschied zu den übrigen Chemotherapeutika sind direkte toxische Effekte auf das Knochenmark sehr selten. Eine milde bis moderate Suppression der drei Zellreihen kann zu einer leichten Anämie führen, eine ausgeprägte Thrombozytopenie oder Leukopenie werden nicht beobachtet [20]. Ebenso treten keine Schädigungen der Haarfollikel und oraler oder gastrointestinaler Schleimhäute auf [20,60].

1.9.2 Immunologische Reaktionen

Immunologische Reaktionen stellen neben der Toxizität auf Pankreas und Gerinnungssystem die schwerwiegendsten unerwünschten Wirkungen einer L-Asparaginase-Behandlung dar. In ausgeprägten Fällen sind sie der therapielimitierende Faktor. Die Immunogenität des Fremdproteins L-Asparaginase begründet sich in der taxonomischen Entfernung vom Ursprungsorganismus, der Komplexität der Molekülstruktur und dem Molekulargewicht. Die bakterielle Herkunft der L-Asparaginase verursacht eine Antigenität, welche bei einer Vielzahl von Patienten eine Immunantwort in Form einer Antikörperproduktion hervorruft. Die Bildung von spezifischen Antikörpern kann sich im menschlichen Organismus auf unterschiedliche Weise äußern. Einerseits beobachtet man klinische Hypersensitivitätsreaktionen, die von lokalen Irritationen an der Injektionsstelle bis hin zu einer lebensbedrohlichen Anaphylaxie reichen [13,29,58]. Andererseits kann eine schnelle Inaktivierung der Enzymaktivität ohne jedes klinische Zeichen vorkommen. Dieser Vorgang wird auch aufgrund der fehlenden Symptomatik als „silent inactivation“ („stille Inaktivierung“) bezeichnet [7,43]. Häufig tritt eine Antikörperbildung auch ohne klinisches Korrelat oder schnelle Inaktivierung der Enzymaktivität auf [43]. Zusätzlich bestehen Mischbilder der immunologischen Reaktionen in jeder Ausprägung.

Die Bedeutung immunologischer Reaktionen auf den Behandlungserfolg und die Prognose der ALL-Erkrankung ist nicht eindeutig geklärt.

Woo et al. konnten keinen Einfluss einer Überempfindlichkeitsreaktion oder Antikörperformation auf die 4-Jahres-Überlebensrate beobachten; nach klinischer Reaktion erfolgte jedoch der sofortige Wechsel von *E. coli* auf *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase. In dieser Studie wurden zudem weder Enzymaktivitäten noch L-Asparagin-Konzentrationen gemessen, so dass ein möglicher Einfluss einer raschen Enzym-inaktivierung unbeobachtet blieb [89].

Larson et al. zeigten in einer Studie, dass Hypersensitivitätsreaktionen bei erwachsenen Patienten auf den Behandlungserfolg keinen Einfluss haben [52].

Auch Albertsen et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen der Formation von Antikörpern gegen *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase und dem Risiko eines ALL-Rezidivs sehen [45].

Panosyan et al. publizierten 2004 Ergebnisse einer Interim-Analyse der CCG-1961-Studie, in der 280 Hochrisiko-Patienten für 30 Monate nach Induktionsende beobachtet wurden. Patienten mit Bildung spezifischer Antikörper ohne klinische Symptomatik („stille Inaktivierung“) zeigten eine signifikant höhere Ereignisrate als die übrigen Patientensubgruppen [65].

Zalewska-Szewczyk et al. evaluierten die Bedeutung von Antikörpern auf den Therapieerfolg in einer Studie, in der Patienten der Standard- und mittleren Risikogruppe mit der Bildung von IgG in der Induktion eine geringe Überlebensrate als Patienten ohne Antikörperformerung aufwiesen [93].

Cheung et al. konnten zeigen, dass vier von sieben Patienten ein Rezidiv erlitten, als ihr IgG-Titer am höchsten war [22].

Auch Kurtzberg et al. postulierten eine geringere Therapieeffektivität durch suboptimale L-Asparagin-Depletion bei „stiller Inaktivierung“ [50].

Abshire et al. veröffentlichten die Ergebnisse einer Studie, welche eine Korrelation zwischen niedrigen L-Asparaginase-Aktivitäten im Serum und der Anwesenheit von Antikörpern gegen *E. coli* L-Asparaginase und PEG-Asparaginase sowie einer geringeren kompletten Remissionsrate für Patienten im ersten ALL-Rezidiv aufzeigte [1].

1.9.2.1 Antikörperformerung

Untersuchungen bei Patienten mit immunologischen Reaktionen auf eine Therapie mit L-Asparaginase haben gezeigt, dass vorwiegend Immunglobuline der Klasse G gebildet werden [22,43,47]. Hohe Titer der Antikörpersubklassen IgG₃ [47] und IgG₄ [22] korrelieren signifikant mit dem Risiko einer Überempfindlichkeitsreaktion.

Obwohl eine Medikamentenüberempfindlichkeit als Sofortreaktion (Typ 1 nach Coombs und Gell) IgE vermittelt ist, konnte eine Korrelation hinsichtlich der Titerhöhe von IgE und dem Auftreten klinischer Symptome nicht gefunden werden [22,43]. Es wird vermutet, dass Antikörper der Subklasse E nur eine untergeordnete Rolle spielen. Fabry et al. erklärten die Ursache anaphylaktischer Reaktionen mit einer Aktivierung des Komplementsystems durch die Bildung von Immunkomplexen aus L-Asparaginase mit IgG und IgM [30].

Die Mehrheit der Patienten unter einer Behandlung mit L-Asparaginase reagiert mit der Bildung von spezifischen Antikörpern. Nach einem bestimmten Zeitpunkt lassen sich im Serum der meisten Patienten unabhängig von einer klinischen Symptomatik Antikörper nachweisen [88]. In der Regel steigt die Produktion der Antikörper mit der Dauer der Exposition, wiederholten Gaben sowie nach einem applikationsfreien Intervall an [65].

Die Inzidenz der Antikörperformation liegt im Durchschnitt bei 60-80% [62,65]. Sie ist damit deutlich höher als die Inzidenz von Hypersensitivitätsreaktionen oder einer schnellen Inaktivierung der Enzymaktivität.

Eine Antikörperbildung führt nicht zwingend zu einer klinischen Symptomatik oder Enzyminaktivierung. Die Höhe der spezifischen Antikörperkonzentration korreliert aber mit dem Risiko, eine Hypersensitivitätsreaktion und/oder schnelle Enzyminaktivierung zu erleiden [8,88,89]. Eine Korrelation zwischen der Höhe der Antikörperkonzentration und dem Schweregrad einer klinischen Reaktion ist nicht gegeben [88]. Ein klarer Zusammenhang zwischen der Formation von Immunglobulinen der Klasse IgG, dem Auftreten von Überempfindlichkeitsreaktionen und einem rapiden Abfall der Enzymaktivität ist in der Literatur wiederholt beschrieben worden [7,20,43,46,65,89,92].

Die Bildung von Antikörpern kann zu einer Beeinträchtigung der pharmakokinetischen Eigenschaften des Enzyms führen. Asselin et al. beobachteten einen Abfall der Halbwertszeit unter nativer L-Asparaginase-Gabe bei Patienten mit einer Hypersensitivitätsreaktion. Gleichfalls führten hohe Antikörpertiter bei Patienten ohne klinische Symptomatik zu einem vorzeitigen Abfall der Enzymaktivität [8].

Bei der Mehrzahl der Patienten wird die maximale Antikörperproduktion durch den erneuten Kontakt mit L-Asparaginase in der Reinduktion erreicht. Der Erstkontakt in der Induktion dient der Sensibilisierung. Aus diesem Grund werden Hypersensitivitätsreaktionen und eine „stille Inaktivierung“ häufig nach einer Reexposition in der Intensifikation gesehen [3,9,65,88]

Dennoch lassen sich bei einigen Patienten bereits vor Therapiebeginn L-Asparaginase-Antikörper nachweisen [39,46]. In einer Population von 350 gesunden Blutspendern konnten bei 22-25% natürlich vorkommende PEG-Asparaginase-Antikörper der Subklasse IgG und IgM nachgewiesen werden [6]. Ob der Nachweis durch die mangelnde Spezifität und Sensitivität der Assays oder durch präexistente L-Asparaginase-Antikörper bedingt ist, ist nicht sicher belegt. Ungeklärt bleibt auch die klinische Relevanz dieser Antikörper.

1.9.2.2 Klinische Hypersensitivitätsreaktion

Die Inzidenz klinischer Hypersensitivitätsreaktionen wird in der Literatur in einem Bereich von 20 - 40% angegeben [13,22,25,43,58,65,89]. Unter einer Behandlung mit den nativen L-Asparaginasen aus *E. coli* oder *Erwinia chrysanthemi* treten derartige Reaktionen etwa gleich häufig auf (33,3% versus 30,0%) [25,26,29]. Für PEG-Asparaginase wird von einigen Autoren eine geringere Immunogenität postuliert [6,66]. Die Inzidenz von Überempfindlichkeitsreaktionen beträgt nach Gabe von PEG-Asparaginase etwa 5-10%; sie steigt jedoch auf etwa 30% bei Patienten, die bereits vorher auf *E. coli* L-Asparaginase reagierten, an [28,33,72,85]. Zudem scheint das Phänomen einer „stillen Inaktivierung“ die vorherrschende Reaktion gegen die pegylierte L-Asparaginase zu sein [10,57].

Die Wahrscheinlichkeit, eine klinische Hypersensitivitätsreaktion zu erleiden, steigt statistisch signifikant mit der Anzahl der vorangegangenen Dosen und einer erneuten Applikation nach einem freien Intervall über einem Monat an [29]. Dellinger et al. konnten einen Anstieg des Risikos von 3,3% auf 32,0% nach der vierten Gabe beobachten [25]. Der Einfluss der Dosis auf das Risiko klinischer Reaktionen wird kontrovers diskutiert [27,38]. Begleitende Methotrexat- oder Prednison- und Vincristin-Gaben senken das Risiko für klinische Reaktionen signifikant [29]. Eine höhere Inzidenz der Antikörperformation ohne simultane Glukokortikoidgabe bestätigten auch Avramis et al.. Neben seltener auftretenden klinischen Reaktionen und hohen Antikörpertitern bewirkte eine gleichzeitige Glukokortikoidgabe eine stärkere Depletion von L-Asparagin und L-Glutamin und beeinflusste damit den Behandlungserfolg positiv [10].

Klinische Überempfindlichkeitsreaktionen manifestieren sich lokal an der Injektionsstelle durch ein Erythem, Ödem, Urtikaria, Schmerzen oder Pruritus. Systemische Reaktionen umfassen außerdem arterielle Hypotonie, Tachykardie, Dyspnoe, Bronchospasmus und Angioödeme bis hin zum anaphylaktischen Schock [13,29,89]. Nach den National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (CTC) erfolgt eine Klassifikation in Grad 0 (keine Reaktion), Grad I (milde lokale Reaktion, < 10 cm und/oder < 24 h), Grad II (Urtikaria), Grad III (Bronchospasmus, schwere lokale Reaktion, > 10 cm und/oder > 24 h) und Grad IV (Arterielle Hypotonie und Anaphylaxie) [60]. Während bei Grad I und II eine Weiterbehandlung mit einer Prämedikation durch Antihistaminika und/oder Glukokortikoide erfolgen kann, erfordern Grad III und IV einen Präparatewechsel. Trotz der Häufigkeit anaphylaktischer Reaktionen sind schwere lebensbedrohliche Verläufe sehr selten zu beobachten [29].

Alle bisherigen Versuche, die Auftretenswahrscheinlichkeit von Hypersensitivitätsreaktionen einzuschätzen, waren nicht erfolgreich. Der Einsatz von L-Asparaginase als Testdosis intradermal oder als i.v.-Bolus vor der eigentlichen Gabe lieferte in > 80% der Patienten falsch-negative Ergebnisse [23,29]. Der Nutzen einer Testdosis erscheint nur gering und in der klinischen Praxis ohne Bedeutung.

Nach dem Auftreten von klinischen Symptomen erfolgt in der Regel ein Wechsel des L-Asparaginase-Präparates. In der Vergangenheit wurde als Ausweichpräparat meist die *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase eingesetzt. Die Möglichkeit des Wechsels begründet sich in der nur eingeschränkten Kreuzreaktivität zwischen *E. coli* und *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase [13,25,55,63,65,85]. Die beiden Präparate weisen infolge ihrer Unterschiedlichkeit in der Aminosäuresequenz und Kristallstruktur verschiedene antigene Epitope auf [87]. Aufgrund der jeweiligen pharmakokinetischen Eigenschaften muss eine Anpassung von Dosis und Administrationsfrequenz zur Aufrechterhaltung einer vergleichbaren Therapieintensität beachtet werden [15]. Etwa 20-25% der Patienten reagieren nach einer Überempfindlichkeitsreaktion erneut mit klinischen Symptomen auf das neue Präparat. Ein erfolgreicher Abschluss der Behandlung ist jedoch in über 90% aller Patienten möglich [13,85,88].

Zum Zeitpunkt der ALL-NOPHO 2000 Studie, aus der Serumproben für die vorliegende Arbeit zur Verfügung standen, war *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase erhältlich.

Nach kurzzeitiger Nichtverfügbarkeit auf dem Arzneimittelmarkt ist *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase wieder beziehbar. Als weitere Ausweichmöglichkeit steht zudem die pegylierte Form der *E. coli* L-Asparaginase zur Verfügung. In der Regel erfolgt der Einsatz auch hier nach dem Auftreten von Hypersensitivitätsreaktionen.

Wang et al. konnten in ihren Untersuchungen kreuzreagierende Antikörper bestimmen und damit eine in vitro Kreuzreaktivität zwischen *E. coli* und PEG-Asparaginase nachweisen [65,5]. Trotz Modifikation des Moleküls sind die gleichen Epitope erhalten geblieben, die zu einer eingeschränkten Kreuzimmunogenität zwischen der aus *E. coli* isolierten und PEG-Asparaginase führen [10]. In Europa wie auch den Vereinigten Staaten sind die native sowie pegylierte Form der L-Asparaginase nur aus demselben *E. coli* Stamm isoliert erhältlich.

1.9.2.3 „Stille Inaktivierung“

Eine weitere Manifestation einer immunologischen Reaktion nach L-Asparaginase-Gabe kann eine rapide Inaktivierung der Enzymaktivität sein. Dieser Vorgang wird auch als „silent inactivation“ („stille Inaktivierung“) bezeichnet, da er ohne klinische Symptomatik abläuft [7,43]. Die Inzidenz der „stillen Inaktivierung“ liegt in einem Bereich zwischen 20 und 30% und tritt damit etwa gleich häufig wie eine klinische Reaktion auf [46,65]. Eine rapide Inaktivierung der Enzymaktivität kann auch bei Patienten mit klinischer Reaktion erfolgen [7,20].

Es besteht eine Korrelation zwischen hohen Titern von Antikörpern und einer schnellen Enzyminaktivierung [7,49]. Untersuchungen zeigen, dass in mehr als 90% bzw. 47% der Patientenseren eine in vitro Inhibition der enzymatischen Aktivität von L-Asparaginase bei Vorhandensein hoher Antikörpertiter stattfindet [50,65]. Für den Abfall der enzymatischen Aktivität werden daher spezifische Antikörper verantwortlich gemacht, die zu einer Neutralisierung der Aktivität und/oder Beschleunigung der Enzym-Clearance führen [8,65]. Der Abfall der Enzymaktivität führt zur suboptimalen L-Asparagin-Depletion [85]. Ein Zusammenhang zwischen PEG-Asparaginase-Antikörpern und einer raschen Enzyminaktivierung ist beschrieben worden [6].

Während Hypersensitivitätsreaktionen vor allem ein Problem der nativen L-Asparaginasen sind [58], scheint die „stille Inaktivierung“ Ausdruck der vorherrschenden immunologischen Reaktion auf PEG-Asparaginase zu sein [10,59]. Diese Aussage wird durch zwei von der BFM-Studiengruppe im Rahmen der Therapiestudie ALL-BFM 95 durchgeführten Drug-Monitoring Programme gestützt. Der routinemässige Präparatewechsel von *E. coli* L-Asparaginase in der Induktion auf PEG-Asparaginase in der Reinduktion zeigte bei zwei Dritteln der Patienten eine Enzymaktivität ≥ 100 U/l über den gewünschten Zeitraum von zwei Wochen. Bei einem Drittel der Patienten kam es jedoch zu einem frühzeitigen Aktivitätsabfall („stille Inaktivierung“). Klinische Überempfindlichkeitsreaktionen wurden nicht gesehen [57]. In einer weiteren Untersuchung wurden unter der Gabe von nativer *E. coli* L-Asparaginase in Induktion und Reinduktion ausschließlich klinische Hypersensitivitätsreaktionen mit einer Inzidenz von 24% beobachtet [58]. Rizarri et al. konnten das Phänomen der „stillen Inaktivierung“ nach Gabe von PEG-Asparaginase in der Induktions- und Reinduktionsphase nur bei einem Patienten beobachten [71].

Die Notwendigkeit eines Drug-Monitoring Programms zur Therapiekontrolle ist durch die möglichen immunologischen Mechanismen, insbesondere den Vorgang der „stillen Inaktivierung“, gegeben. Die Überwachung der L-Asparaginase-Aktivität stellt ein wichtiges und hilfreiches Instrument in der Erkennung von Unterbehandlungen und der Vermeidung suboptimaler therapeutischer Effekte dar.

1.10 Methoden zur Messung von L-Asparaginase-Antikörpern

Da sich bereits kurz nach Einführung der L-Asparaginase in die Behandlung der ALL immunologische Reaktionen als therapielimitierender Faktor herausstellten, wurden zahlreiche Untersuchungen zur Bestimmung von Antikörpern durchgeführt. Zum Nachweis der spezifischen Antikörper werden verschiedene Methoden wie Immunodiffusion [62], radio immuno sorbent assays (RIA) [22,43] oder enzyme linked immuno sorbent assays (ELISA) [46,65,84,85,88,89] eingesetzt.

Die Etablierung einer Methode für einen rationalen und sinnvollen Gebrauch im klinischen Alltag ist bis heute erfolglos geblieben. Gegenwärtig zur Verfügung stehende Assays sind weder spezifisch noch sensitiv genug, um eine prognostische Aussage zu treffen. Sie eignen sich lediglich zur Einschätzung von Tendenzen, lassen jedoch keine sichere Auskunft über zu erwartende Reaktionen zu.

Abbildung 7 stellt graphisch Daten von Woo et al. dar, die mittels eines ELISA Antikörpertiter gegen L-Asparaginase bestimmten. Im untersuchten Patientenkollektiv wurde in der Induktionsphase mit *E. coli* L-Asparaginase behandelt und nach dem Auftreten von Hypersensitivitätsreaktionen bei einigen Patienten auf *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase umgestellt. Die Messung der Antikörpertiter erfolgte jeweils zum Ende der Induktion und Reinduktion unter Einsatz des L-Asparaginase-Gesamtproteins als Antigen in einem ELISA. Es wird deutlich, dass auch bei Patienten ohne immunologische Reaktion Antikörpertiter gemessen werden konnten. Grundsätzlich ähnelte sich der Titerverlauf beider Gruppen; innerhalb der Patientengruppe mit klinischer Reaktion gab es sogar Abfälle der Titer [88]. In einer weiteren Studie von Woo et al. wurden bei Patienten mit Antikörpern gegen L-Asparaginase in nur 56% der Fälle eine Hypersensitivitätsreaktion beobachtet. 44% zeigten trotz Bestimmung von Antikörpern keine klinische Reaktion. 18% der Patienten erlitten dagegen ohne Nachweis von Antikörpern eine manifeste klinische Reaktion [89]. Auch Wang et al. konnten in Messungen am Ende der Reinduktionsphase keinen signifikanten Unterschied der Antikörper-Konzentration zwischen Patienten mit und ohne Hypersensitivitätsreaktion finden [85].

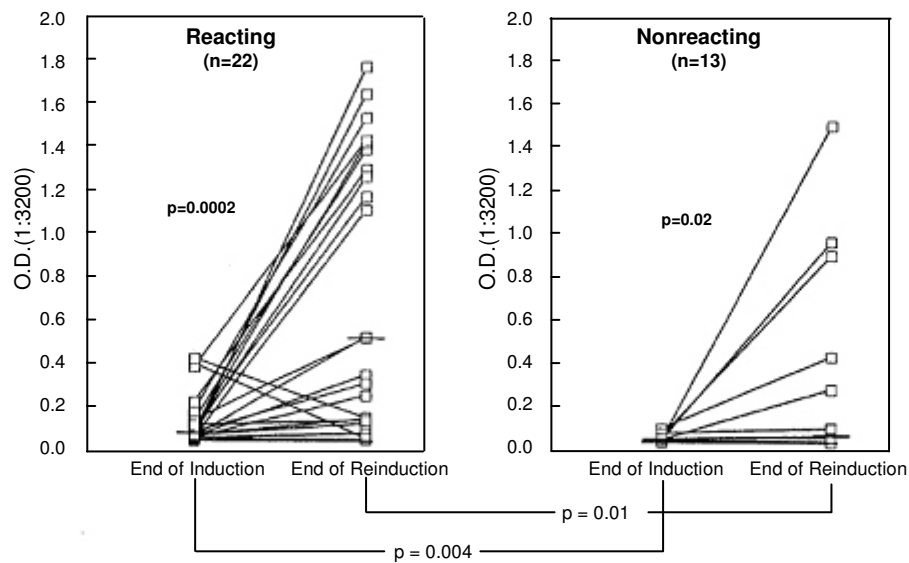


Abb. 7: IgG-Titer von Patienten mit und ohne allergische Reaktion am Ende der Induktions- und Reinduktionsphase (aus Woo et al. [88])

Ein Problem der angewandten Methoden sind wahrscheinlich Kreuzreaktionen zwischen dem L-Asparaginase-Protein und Antikörpern, die sich im menschlichen Serum befinden. Diese Vermutung wird durch Messungen gestützt, die bei gesunden Personen ohne vorherigen Kontakt mit L-Asparaginase-Antikörper nachweisen konnten [64]. Diese Kreuzreaktionen beeinträchtigen in erheblichem Maße die prognostische Aussagekraft der verfügbaren Assays und machen sie für einen Einsatz im klinischen Alltag unbrauchbar.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Da immunologische Reaktionen den Therapieverlauf und -erfolg mitunter entscheidend beeinträchtigen können, ist die Einsicht in den immunologischen Status des Patienten vor allem zu Beginn einer erneuten L-Asparaginase-Gabe in der Reinduktions- oder Rezidivtherapie von enormer Bedeutung. Die Kenntnis über den Antikörperstatus des einzelnen Patienten könnte eine Grundlage für die weitere Therapieplanung bilden. Der Nachweis von spezifischen Antikörpertitern könnte zur Vorhersage einer potentiell zu erwartenden immunologischen Reaktion führen. Ein Eingreifen durch einen Präparatewechsel wäre damit vorzeitig möglich.

Aktuell erfolgt die Therapieüberwachung durch die Messung der L-Asparaginase-Aktivität. Dabei postuliert man orientierend an den Untersuchungen von Riccardi et al. ab einem Aktivitätswert ≥ 100 U/l, dass eine vollständige Depletion von L-Asparagin im Serum vorliegt [70]. Die gemessenen Aktivitäten dienen somit indirekt als Hinweis auf das Vorliegen von inaktivierenden Antikörpern. Dieses Drug-Monitoring Programm ist mit häufigen Blutentnahmen verbunden und bedeutet oft eine große Belastung für den Patienten. Die Messung der Aminosäurekonzentration selbst wird im klinischen Alltag nicht durchgeführt, da dies sehr aufwendig und mit einer hohen Fehlerquote versehen ist.

Gegenwärtig steht keine Nachweismethode von spezifischen Antikörpern, die gegen bestimmte Epitope der L-Asparaginase gerichtet sind, zur Verfügung. Die vorhandenen Assays, meist auf der Basis eines enzyme linked immuno sorbent assays (ELISA), setzen das L-Asparaginase-Gesamtprotein als Antigen ein. Problem dieser Assays sind Kreuzreaktionen von primär gegen andere Proteine gerichteten Antikörpern. Dies führt häufig zu falsch-positiven Resultaten und damit zu einer Einschränkung der prognostischen Aussagekraft der Messmethode.

Die Beeinträchtigung der Assays durch Kreuzreaktionen führte zu den Überlegungen in der Marburger Arbeitsgruppe, eine epitopspezifische Methode zu entwickeln. Grundlage bildete die Idee, definierte L-Asparaginase-Sequenzen als Antigen einzusetzen, um so das Antikörper-Screening auf klinisch relevante Epitope zu beschränken und Kreuzreaktionen weitestgehend auszuschließen.

In ersten Untersuchungen wurden willkürliche Aminosäuresequenzen des L-Asparaginase-Proteins verwendet. Die Auswahl der Fragmente erfolgte zufällig, da zu diesem Zeitpunkt noch keine detaillierte Informationen über klinisch relevante Epitope der *E. coli* L-Asparaginase vorlagen. Die Fragmente wurden als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert, um eine möglichst ähnliche Faltung der Proteine analog zur Tertiärstruktur des Gesamtproteins zu erreichen. Die Fusionsproteine wurden schließlich als Antigene in einem ELISA gegen Patientenserum gescreent. Die Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen der Inaktivierungsrate des Enzyms und Titern gegen bestimmte Fragmente. Damit konnte die grundsätzliche Durchführbarkeit einer epitopspezifischen Methode bestätigt werden [69]. Auf der Grundlage eines theoretischen „Epitop-Mappings“ durch ein Computer-Strukturmodell wurden weitere GST-Fusionsproteine produziert, die jedoch nur in wenigen Fällen eine eindeutige Bindung von Antikörpern aufwiesen [14]. Ein experimentelles

„Epitop-Mapping“ zur Identifizierung von B-Zell-Epitopen der *E. coli* L-Asparaginase wurde initiiert [87]. Auf dieser Grundlage wurden erneut GST-Fusionsproteine hergestellt, die in der vorliegenden Arbeit als Antigene im ELISA zur Verfügung standen und auf Antikörperbindung von pädiatrischen Patientenseren aus der NOPHO-ALL 2000 Studie untersucht wurden.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung einer direkten Nachweismethode von spezifischen Antikörpern gegen L-Asparaginase. Mit Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der Messmethode wären dann nicht mehr nur Aussagen über Tendenzen möglich, sondern auch eine prognostische Einschätzung einer zu erwartenden immunologischen Reaktion.

Die Kenntnis über spezifische Antikörper und Epitope der *E. coli* L-Asparaginase mit klinischer Relevanz bei einer immunologischen Reaktion könnte zukünftig zur vorzeitigen Erkennung und Vermeidung dieser Reaktionen beitragen. Der Einsatz dieses Assays im Rahmen eines rationalen und sinnvollen Drug-Monitoring Programms könnte zu einer unmittelbaren Therapieverbesserung in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie führen.

MATERIAL UND METHODEN

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien

Alle Laborchemikalien wurden im Reinheitsgrad pro analysis verwendet. Zur Herstellung von Lösungen und Puffer wurde deionisiertes Wasser verwendet.

Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (30%/0,8%)	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ampicillin	Sigma, Steinheim
2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate(6)] diammonium salt (ABTS)	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blau R 250	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau Na-Salz	Roth, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DDT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Fluka, Buchs (Schweiz)
Glutathion (reduziert)	Merck, Darmstadt
Glycin	Fluka, Buchs (Schweiz)
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Fluka, Buchs (Schweiz)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Luria Broth Base (LB)	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Fluka, Buchs (Schweiz)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tricine Pufferan®	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Roth, Karlsruhe
Trizma® Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma, Steinheim
Tween® 20 pure	Serva, Heidelberg

2.2 Enzyme

Asparaginase 10.000 medac	Medac, Hamburg
PreScission® Protease	Amersham Biosciences, Freiburg

2.3 Antikörper

Anti-Human IgG, Peroxidase, Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Asparaginase IgG, Kaninchen	Biomol, Hamburg

2.4 Vektor

pGEX-6P-3

Amersham Biosciences, Freiburg

2.5 Bakterienstamm

E. coli BL21 (im GST-Kit enthalten)

Amersham Biosciences, Freiburg

2.6 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch Servapor® Ø 6 mm
 Filter Millex® -HV 0,45 µm
 Mikrotiterplatten F 96 Maxisorp
 Page Ruler® Prestained Protein Ladder
 SeeBlue® Plus2 Prestained Standard
 GSTrap® FF 1ml

Serva, Heidelberg
 Millipore, Schwalbach
 Nunc, Wiesbaden
 Fermentas, St. Leon-Rot
 Invitrogen, Karlsruhe
 Amersham Biosciences, Freiburg

2.7 Geräte

Autoklav 5075 ELV
 Autoklav 2540 EL
 Biofuge pico
 Chromatographie System ÄKTA® prime
 Gelelektrophoresevorrichtung
 Heizblock DB-2A
 Mikrotiterplattenleser ELx808
 Mikrotiterplattenwascher PW 40
 Minifuge RF
 pH Meter Toledo 340
 Schüttelinkubator AK 82
 Spectrophotometer Ultrospec 3000
 Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro
 Ultraschall Sonoplus GM 72
 Waage BP 2100 S
 Waage R 160 P
 Wärmeschrank B 5050 E
 Zentrifuge J2-MC

Systec, Wetztenberg
 Systec, Wetztenberg
 Heraeus, Hanau
 Amersham Biosciences, Freiburg
 Phase, Lübeck
 Thermo-Dux, Wertheim/Main
 BioTek GmbH, Bad Friedrichshall
 Bio-Rad, München
 Heraeus, Hanau
 Mettler, Gießen
 Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
 Amersham Biosciences, Freiburg
 Amersham Biosciences, Freiburg
 Bandelin, Berlin
 Sartorius, Göttingen
 Sartorius, Göttingen
 Heraeus, Hanau
 Beckmann, München

2.8 PC-Programme und Internet-Links

KC Junior (Mikrotiterplattenleser)
 MS Office 2003
 Sigma Plot 8.0
 SPDB-Viewer
 SPSS 16.0
 Strukturmodell

BioTek GmbH, Bad Friedrichshall
 Microsoft Deutschland GmbH
 Jandel Scientific, Erkrath
<http://www.expasy.ch/spdbv>
 SPSS GmbH Software, München
<http://www.rcsb.org>

2.9 Statistische Auswertung

Die Analyse der Daten erfolgte unter Einsatz des Statistik Programms SPSS 16.0 für Windows. Aufgrund der nicht normal verteilten Daten wurden nicht-parametrische Testverfahren angewendet. Als Fehlerwahrscheinlichkeit für die statistische Signifikanz wurde $p \leq 0,05$ zugrunde gelegt.

Zum Vergleich der einzelnen Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine und das Gesamtprotein zwischen der Kontrollgruppe, der Gruppe der therapeutischen Aktivität und „stillen Inaktivierung“ wurde zunächst der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Es wurden die jeweiligen Werte getrennt zum Zeitpunkt der Induktion, Reinduktion und der Differenz aus Reinduktion und Induktion verwendet. Zeigte sich eine statistische Signifikanz, wurde zum Paarvergleich der drei Gruppen der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Die vergleichende Analyse der einzelnen Antikörpertiter innerhalb einer Gruppe wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Zur Klärung eines Unterschieds zwischen den Antikörpertitern gegen die sechs Fragmente und das L-Asparaginase-Gesamtprotein in der Gruppe der „stillen Inaktivierung“ wurde zuerst der verallgemeinerte Vorzeichen Test von Friedman angewendet. Verglichen wurden die sieben Messwerte zum Zeitpunkt der Induktion, Reinduktion und der Differenz aus Reinduktion und Induktion. Ergab sich ein p -Wert $\leq 0,05$ wurde jedes GST-Fusionsprotein gegen das Gesamtprotein mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf Signifikanz überprüft.

2.10 Patientenmaterial

Die Untersuchungen innerhalb der retrospektiven Studie wurden im Zeitraum von Juli 2004 bis Oktober 2005 im Institut für Physiologische Chemie des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg durchgeführt. Die Arbeiten erfolgten in freundlicher Kooperation mit der Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO), einer 1981 gegründeten multizentrischen Studiengruppe zur Behandlung von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie in skandinavischen Ländern (Dänemark, Finnland, Island, Norwegen und Schweden).

Zur Verfügung standen 265 Serumproben von 61 pädiatrischen Patienten, bei denen im Zeitraum von September 2001 bis Juli 2003 eine neu aufgetretene akute lymphatische Leukämie diagnostiziert worden war. Alle Patienten wurden im Rahmen der NOPHO-ALL 2000 Studie behandelt.

32 der Patienten waren weiblichen und 29 männlichen Geschlechts; das Alter reichte zum Zeitpunkt des Induktionsbeginns von 1 Jahr und 8 Monate bis 15 Jahre (Median 5 Jahre und 2 Monate).

Der Einschluss in die NOPHO-ALL 2000 Studie erfolgt nach Diagnosestellung einer B-Vorläufer- oder T-Zell-ALL im Lebensalter von > 1 Jahr und < 15 Jahren. Die Zuteilung in unterschiedliche Risikogruppen geschieht durch einen Algorithmus, der neben der Leukozytenzellzahl, Zellmorphologie, ZNS- oder Testes-Befall und zytogenetischen Kriterien auch das Ansprechen der Initialtherapie (gutes Ansprechen: morphologischer Blastenanteil $<25\%/<5\%$ im Knochenmark an Protokolltag 15/29 der Induktion) berücksichtigt. Entsprechend sieht das Protokoll eine Niedrigrisikogruppe mit einem Standard-Intensitäts- (SI) und einem mittleren Intensitäts-Therapieprotokoll (II) vor sowie eine Hochrisikogruppe mit intensiviertem- (I), stark intensiviertem- (VI) und extra intensiviertem-Therapieprotokoll (EI).

Die Induktionsphase gestaltet sich in allen Risikogruppen gleich. Jeder Patient erhält native *E. coli* L-Asparaginase (Asparaginase medac) $6.500 \text{ U/m}^2 \text{ KOF}$ i.m. an den Protokolltagen 37, 40, 44 und 47.

Eine erneute Gabe von Asparaginase in der Reinduktionsphase erfolgt für Patienten im mittleren Intensitätsprotokoll (II) an den Tagen 120, 123, 127 und 130; für Patienten im intensivierten- (I) und stark intensiviertem-(VI) Therapieprotokoll an den Tagen 197, 200, 204 und 207; im jeweiligen Protokollblock Tag 1, 4, 8 und 11 entsprechend.

Die Abnahme der Blutproben wurde jeweils vor Asparaginase-Gabe durchgeführt. Nach Zentrifugation wurden die Serumproben auf Trockeneis verschickt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

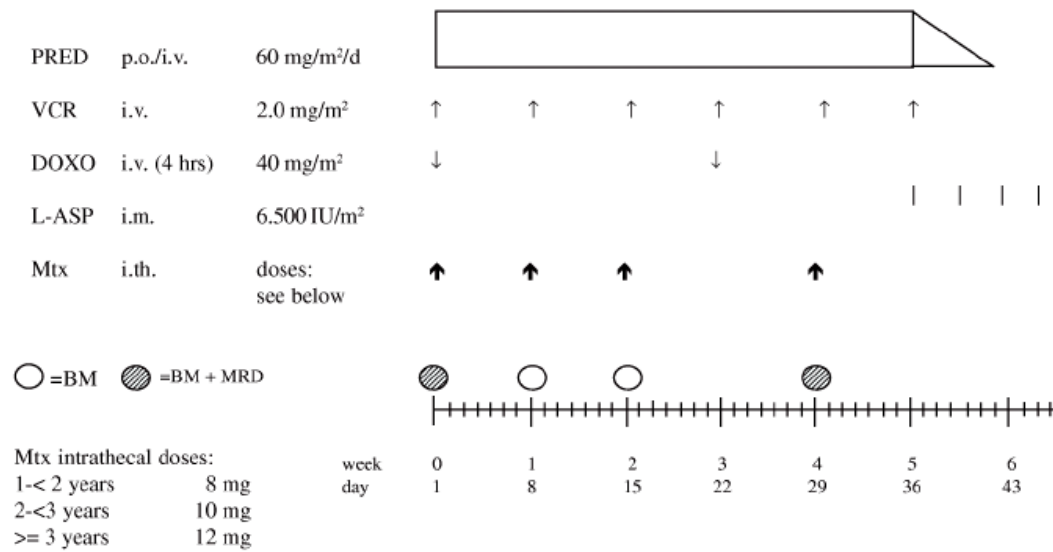
INDUCTION - Protocol SI/II (Standard/Intermediate Intensity)

Abb. 8: Übersicht des Induktionsprotokolls (Standard- und mittlere Intensitätsrisikogruppe) (aus Treatment Protocol NOPHO-ALL 2000)

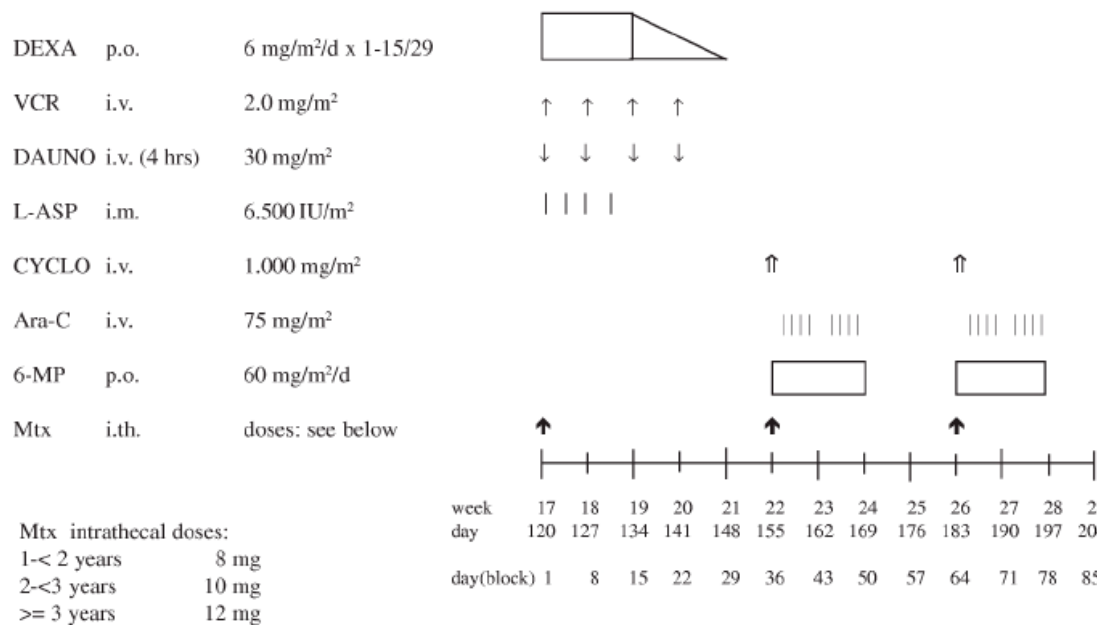
DELAYED INTENSIFICATION - Protocol II (Intermediate Intensity)

Abb. 9: Übersicht des Reinduktionsprotokolls (mittlere Intensitätsgruppe) (aus Treatment Protocol NOPHO-ALL 2000)

3. METHODEN

3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Die GST-Fusionsproteine wurden durch das Einfügen von spezifischen Genfragmenten des *E. coli* Asparaginase-Genoms in einen pGEX-6P-3 Vektor hergestellt. Grundlage für die Auswahl der Genfragmente bildeten vorangegangene Arbeiten in der Marburger Arbeitsgruppe, die sich mit der Identifizierung von B-Zell-Epitopen durch experimentelles „Epitop-Mapping“ mittels „Phage-Display“ und der „SPOTs“-Methode beschäftigten [87]. Die verwendeten Peptide sind dem Anhang zu entnehmen. Die molekularbiologischen Methoden wurden von Herrn Dr. med. Hans-Joachim Müller durchgeführt.

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten. Nach Trennung der komplementären DNA-Stränge binden Oligonukleotide (Primer) an Anfang und Ende der zu amplifizierenden Stelle der DNA (Template). Die Zugabe von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) und DNA-Polymerase führt zur Synthese von doppelsträngiger DNA aus der einzelsträngigen Vorlage. Durch Wiederholung des Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation kann DNA exponentiell vervielfältigt werden.

Für die PCR-Ansätze wurden 4 µl Template, je 5 µl Oligonukleotide, 1 µl Pfu-DNA-Polymerase, 5 µl DNA-Polymerase Puffer, 1 µl 2 mM dNTP und H₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Nach initialer Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten wurden 30 Amplifikationszyklen durchgeführt. Diese bestanden aus Denaturierung bei 95°C für 1 Minute, Anlagerung der Primer bei 65°C für 1 Minute und Verlängerung durch die DNA-Polymerase bei 72°C für 3 Minuten. Abschließend erfolgte die Inkubation bei 72°C für 10 Minuten. Die verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt.

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Ansätze wurden ihrer Peptidgröße entsprechend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 1%ige (w/v) Agarose-Gele auf TAE-Pufferbasis (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA) mit 1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Nach Zugabe von Probenpuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerin) zu den DNA-Fragmenten erfolgte die Auftrennung im elektrischen Feld.

Bei Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Bestrahlung konnten sie mit einem Längenstandard als Referenz verglichen und durch Fotografieren dokumentiert werden.

3.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmungen

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit laut Herstellerhandbuch wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei wurde eine $A_{260 \text{ nm}}$ von 1 mit einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml gleichgesetzt. Die Kontamination der DNA mit Proteinen wurde durch Messung der $A_{280 \text{ nm}}$ bestimmt. Der Quotient $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ sollte für ein hohes Maß an Reinheit zwischen 1,8 -2,0 liegen.

3.1.4 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung von *E. coli* Bakterien mit der Fähigkeit zur Plasmid DNA-Aufnahme wurden 5 ml Vorkulturen der *E. coli* BL21 Zellen in LB-Medium über Nacht bei 37°C angezüchtet. 2 ml wurden in jeweils 50 ml LB-Medium bis zu einer O.D. bei 600 nm von 0,5 im Schüttler inkubiert und anschließend bei 5.000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienzellsediment in 10 ml eiskalter Calciumchloridlösung (60 mM CaCl_2 , 10 mM PIPES, 15% (v/v) Glycerol, pH 7,4) resuspendiert und auf Eis gekühlt 90 Minuten inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation mit 5.000 rpm über 5 Minuten bei 4°C erfolgte die Resuspension der Zellpellets unter Zugabe von 2 ml Calciumchlorid und 1 ml 87% Glycerol. Die Bakterienstocks wurden zu je 200 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.1.5 Klonierung

3.1.5.1 Restriktion

Restriktionsendonukleasen erzeugen doppelsträngige DNA-Schnittstellen an spezifischen Sequenzen. Der Restriktionsansatz umfasste jeweils 30 µl PCR-Produkt oder 20 µl pGEX-6P-3 Vektor, 2,5 µl Bam HI (10 U/µl), 2,5 µl Eco RI (10 U/µl), 5 µl Puffer und H_2O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Der Restriktions-Verdau dauerte 3 Stunden bei 37°C.

3.1.5.2 Dephosphorylierung

Die Entfernung der 5'-Phosphatgruppen an der linearisierten Vektor-DNA wurde zur Vermeidung von Ringschlüssen durch Inkubation von pGEX-6P-3 mit 1 µl calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP, 1 U/µl) und 4 µl Puffer über 30 min bei 37°C erreicht. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 85°C für 15 Minuten.

3.1.5.3 Ligation

Vor dem Einfügen der DNA-Fragmente in den pGEX-6P-3 Vektor wurde eine erneute Aufreinigung mit QIAquick PCR Purification Kit und photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

pGEX-6P-3 Vektor und die zu inserierende DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 gemischt. Die Berechnung erfolgte nach Handbuch zum Kit. Die Reaktionsansätze umfassten neben Vektor-DNA und Insert-DNA, T4-DNA-Ligase (30 U/µl), Ligase-Puffer und H₂O. Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden bei Raumtemperatur, danach wurde die Ligase bei 65°C für 15 Minuten hitzeinaktiviert. Zur Kontrolle wurde Vektor ohne Insert-DNA mitgeführt.

3.1.5.4 Transformation

200 µl kompetenter *E. coli* BL 21 Zellen wurden mit jeweils 20 µl der Ligationsansätze für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde für 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und mit 1 ml LB-Medium versetzt, um dann für 45 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert zu werden. Anschließend wurden 100 µl Lösung auf Agarplatten mit 0,1 g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank gelagert.

Je Ansatz mit unterschiedlichem Insert wurden sechs Kolonien von den Agarplatten in Übernachtkulturen überführt und Bakterienstocks aus 500 µl Kulturlösung und 500 µl 87% Glycerol angelegt und zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle des Klonierungsprodukts wurden aus denselben Übernachtkulturen 1,5 ml Lösung unter Einsatz des QIAprep Spin Miniprep Kit laut Herstellerprotokoll aufgereinigt. Mit den Aufreinigungsprodukten wurde nach vorstehend beschriebenem Protokoll die PCR durchgeführt und anschließend elektrophoretisch in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Nach Präparation der Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur wurden Proben an MWG Biotech (Ebersberg) zur Sequenzierung geschickt.

3.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

Alle Arbeiten mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen wurden gemäß dem Gentechnikgesetz (GenTG) von 1990 durchgeführt und entsprachen der Sicherheitsstufe S1. Alle mit Mikroorganismen kontaminierten Materialien und Lösungen wurden gesammelt und 20 Minuten bei 121 °C und 2,5 bar dampfsterilisiert. Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführt.

3.2.1 Bakterienwachstum

25 g LB-Medium wurde in 1 l H₂O aufgelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Durch Zusatz des Antibiotikums Ampicillin in einer Konzentration von 0,1 g/ml wurde ein Selektivmedium hergestellt.

LB-Platten wurden nach Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar zum Medium durch das Ausgießen von sterilen Petrischalen mit 25 ml hergestellt. Bei 4° C waren die LB-Platten mehrere Monate verwendbar.

LB-Medium	pH 7,4
10 g/l	Pepton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl

3.2.2 Kultivierung

Zur Kultivierung von *E. coli* in LB-Medium wurden Bakterien aus den 87% Glycerolstocks auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Platten mit Bakterienkolonien wurden bei 4°C gelagert und standen etwa zwei Wochen zur weiteren Verfügung.

Für die Herstellung von Vorkulturen wurde eine einzelne Kolonie von *E. coli* Bakterien der LB-Platten verwendet, um 50 ml LB-Medium, versetzt mit 0,1 g/ml Ampicillin, anzuimpfen. Anschließend wurde diese Kultur über 24 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert.

3.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.3.1 Proteinexpression

Die Expression der L-Asparaginase-Proteinfragmente erfolgte als Fusionsprotein mit *Schistosoma japonicum* Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* BL 21. Der verwendete Vektor pGEX-6P-3 steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, welcher durch IPTG induziert werden kann. Abbildung 10 zeigt den Expressionsvektor; die Sequenz ist im Anhang dargestellt.

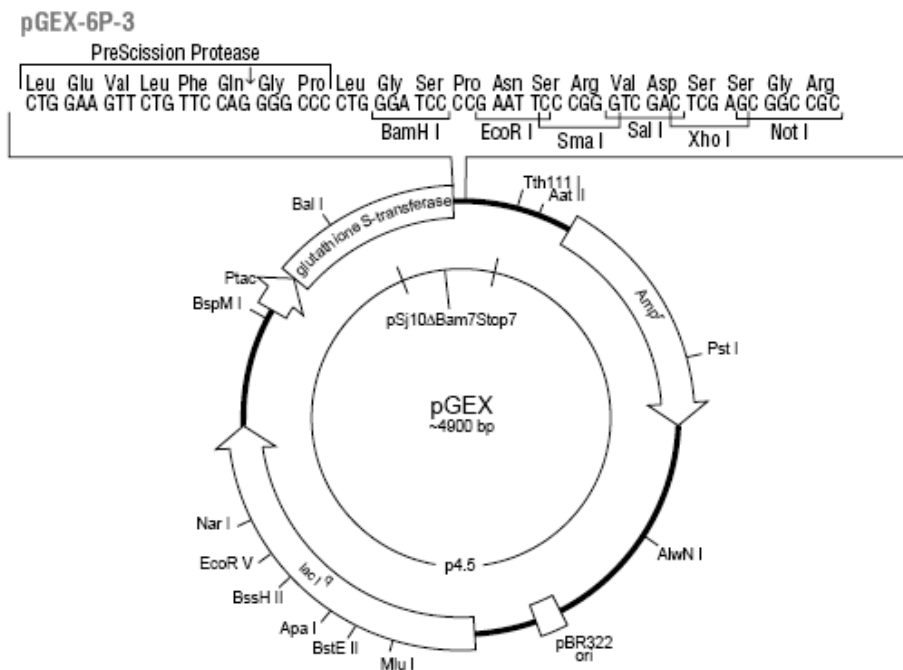


Abb. 10: Glutathion-S-Transferase Fusionsvektor pGEX-6P-3 (aus GST Gene Fusion Handbook, Amersham Biosciences)

Die Vorkulturen wurden in 500 ml selektives LB-Medium überführt. Die Inkubation bis zu einer optischen Dichte (O.D. _{600nm}) von 0,6 - 0,8 erfolgte bei 37°C im Schüttler. Nach Erreichen der gewünschten O.D. wurde die Kulturlösung mit 1 µl/ml 0,5 M IPTG-Lösung induziert. Die Proteinexpression wurde bei 37°C über 4 Stunden im Schüttler fortgesetzt.

Anschließend wurde das Medium bei 5.000 rpm über 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 25 ml PBS-Puffer resuspendiert. Es erfolgte ein erneutes Zentrifugieren bei 4.000 rpm über 25 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde gleichfalls verworfen und das Pellet bei -20°C zur weiteren Verarbeitung gelagert.

PBS-Puffer		pH 7,4
	150 mM NaCl	
	16 mM K_2HPO_4	
	4 mM KH_2PO_4	

Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Als Proben wurden 1 ml der Kulturlösung nach Überführung der Vorkultur in das 500 ml Medium, vor Beginn und am Ende der Induktionsphase entnommen. Die Proben wurden jeweils bei 5.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren.

3.3.2 Proteinaufreinigung

Das Zellpellet aus den Schritten der Proteinexpression wurde in 25 ml Eis-gekühltem PBS-Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Ultraschall (15 sec Puls/ 15 sec Pause) über 10 Minuten. Anschließend wurde vorsichtig 20% Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1% hinzugegeben und über 30 Minuten durchmischt. Bei beiden Schritten wurde die Lösung auf Eis gekühlt, um einer übermäßigen Erwärmung vorzubeugen. Nach Zentrifugation mit 13.800 rpm über 10 Minuten bei 4°C wurde der Überstand durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Die Lösung wurde umgehend weiterverarbeitet.

Zum Nachweis der Proteine durch eine SDS-PAGE wurden jeweils eine Probe des filtrierten Überstandes sowie des resuspendierten Zellpellets entnommen und bei -20°C gelagert.

3.3.2.1 Aufschluss der „Inclusion Bodies“

Bei der Expression von drei der sechs GST-Fusionsproteine kam es zur Bildung von „Inclusion bodies“. Diese bestehen aus dichten, schwerlöslichen Aggregaten, die sich überwiegend nicht im Überstand befinden. Für den Aufschluss wurde die Suspension zunächst nach Ultraschallbehandlung mit 13.800 rpm über 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 16 ml 8 M Harnstoffpuffer resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand 3 Stunden bei 4°C gegen 2 l Binde-Puffer dialysiert, dabei wurde nach 1,5 Stunden der Dialysepuffer gewechselt. Die Suspension wurde bei 13.800 rpm über 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter

filtriert und umgehend weiterverarbeitet. Eine Probe wurde für den Nachweis der Proteine für die SDS-PAGE entnommen und bei -20 °C gelagert.

Harnstoffpuffer	pH 8,5
8 M $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	
0,35 M NH_4HCO_3	

3.3.2.2 Affinitätschromatographie

Die Methode der Affinitätschromatographie ermöglicht eine effiziente und einfache Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus Bakterienlysaten. Grundlage ist eine reversible Interaktion zwischen dem GST-Fusionsprotein und dem spezifischen Liganden Glutathion, der an eine Sepharose-Matrix gebunden ist.

Dabei erfolgt in einem ersten Schritt die Bindung des Fusionsproteins spezifisch und reversibel an den Liganden, während übriges ungebundenes Material ausgewaschen wird. Im zweiten Schritt wird das gebundene Protein aus der Bindung mit dem Liganden durch Zugabe von hoch konzentriertem reduzierten Glutathion gelöst.

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte unter Einsatz eines Chromatographie-Systems (ÄKTA® prime, Amersham Biosciences) und GSTrap® FF 1 ml Säulen, die mit Glutathion Sepharose 4 Fast Flow bepackt waren. Die maximale Bindungskapazität von rekombinantem Protein betrug 10-12 mg pro Säule. Alle verwendeten Chemikalien und Lösungen wurden zuvor entgast und durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert. Erster Schritt war die Equilibration der Säule mit Binde-Puffer unter Einsatz des 10-fachen Säulenvolumens und einer Flussgeschwindigkeit von 1-2 ml/min. Anschließend wurde die Probe mit einem Fluß von 0,2-1 ml/min aufgetragen. Danach wurde die Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen Binde-Puffer gewaschen. Als letzter Schritt erfolgte die Elution der Proteine mit 10 ml Elutions-Puffer und dem fraktionierten Auffangen in sterilen 1 ml Eppendorf-Cups.

Die erhaltenen Proteinlösungen wurden maximal für 24 Stunden bei 4 °C aufbewahrt, dann bei -20 °C eingefroren. Die Kontrolle der enthaltenen Proteine wurde durch eine SDS-PAGE geführt. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte durch UV-Spektroskopie.

Binde-Puffer	pH 7,3
140 mM NaCl	
2,7 mM KCl	
10 mM Na_2HPO_4	
1,8 mM KH_2PO_4	

Elutions-Puffer		pH 8,0
	50 mM Tris-HCl	
	10 mM Glutathion, reduziert	

3.3.4 Entfernung des GST-Anteils

Neben Verwendung der GST-Fusionsproteine wurden in separaten Ansätzen die L-Asparaginase-Proteinfragmente als Antigene eingesetzt. Die Abtrennung des GST-Anteils erfolgte unter Einsatz von PreScission® Protease, einem Fusionsprotein aus GST und humanen Rhinovirus 3C Protease. Diese erkennt spezifisch die Aminosäuresequenz Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro und trennt die Bindungen zwischen Gln und Gly.

pGEX-6P-3

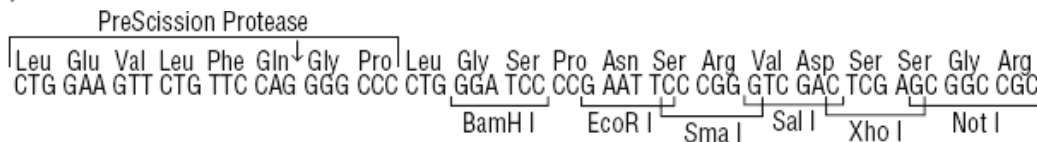


Abb. 11: Schnittstelle der PreScission Protease (aus GST Gene Fusion Handbook, Amersham Biosciences)

Dem Aktivitätsmaximum der Protease entsprechend wurden alle Arbeiten bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Zunächst wurde die GSTrap® FF Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen mit Binde-Puffer equilibriert. Danach erfolgte das Auftragen der Probe mit einer niedrigen Flußgeschwindigkeit von 0,2-1ml/min. Anschließend wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen mit Binde-Puffer gewaschen. Ein zweiter Waschschritt wurde mit dem 10-fachen Säulenvolumen mit Schneide-Puffer ausgeführt. Zur proteolytischen Spaltung wurde die Säule mit 160 Einheiten der PreScission® Protease versetzt und über 4 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Elution erfolgte mit dem 3-fachen Säulenvolumen mit Schneide-Puffer in sterile 1 ml Eppendorf-Cups.

Schneide-Puffer		pH 7,0
	150 mM NaCl	
	50 mM Tris-HCl	
	1 mM EDTA	
	1 mM DTT	

3.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm in einem Photometer ermittelt. Die Proben wurden dafür 1:10 verdünnt und gegen Elutions-Puffer als Leerwert gemessen. $A_{280\text{nm}} = 1$ wurde einer Konzentration von 0,5 mg/ml Protein gleichgesetzt.

Die aus der Aufreinigung erhaltenen Fraktionen des Eluats wurden anschließend gepoolt, auf eine $A_{280\text{nm}} = 1$ verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der qualitative Nachweis der Proteinexpression erfolgte durch Auftrennung über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [51]. Durch Natriumlaurylsulfat (SDS), ein anionisches Detergens, werden Proteine denaturiert und mit einer negativen Nettoladung versehen, die ihrem Molekulargewicht proportional ist. Im elektrischen Feld können die Proteine dann entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden.

Probenpuffer (4-fach)

0,25 M	Tris, pH 6,8
8% (v/v)	2-Mercapto-Ethanol
40% (v/v)	Glycerin
4x10 ³ % (w/v)	Bromphenolblau

Laufpuffer

0,25 M	Tris, pH 8,3
1,92 M	Glycin
35 mM	SDS

Die aus den Schritten der Proteinexpression sowie Aufreinigung entnommenen Proben wurden in 100 µl PBS-Puffer resuspendiert und bei hohem Proteingehalt 1:10 verdünnt. Die erhaltenen Suspensionen wurden mit Probenpuffer vermischt und bei 94°C über 10 Minuten im Heizblock denaturiert. Nach Pippettierung in die Taschen des Sammelgels wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Sobald die Banden das Trenngel erreicht hatten, wurde auf 200 V erhöht. Als Molekularmassenmarker diente PageRuler® Prestained Protein Ladder.

Die Gele wurden für 45 Minuten bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung inkubiert und danach für 24 Stunden, bis der Hintergrund Coomassie frei war, in der

Entfärbelösung belassen. Die Dokumentation der Gele erfolgte durch Scannen oder Fotografieren.

Trenngel (12%)

0,500 ml	10% (w/v) SDS
16,750 ml	H ₂ O
12,000 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
20,000 ml	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
0,250 ml	10% (w/v) APS
0,125 ml	TEMED

Sammelgel (5%)

0,250 ml	10% (w/v) SDS
15,250 ml	H ₂ O
6,250 ml	0,5 M Tris, pH 6,8
3,250 ml	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
0,125 ml	10% (w/v) APS
0,050 ml	TEMED

Coomassie-Färbelösung

30% (v/v)	Isopropanol
10% (v/v)	Essigsäure
0,1% (w/v)	Coomassie R

Entfärbelösung

7,5% (v/v)	Essigsäure
5% (v/v)	Ethanol

3.3.7 Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Tris-Tricin-SDS-PAGE-System nach Schagger und von Jagow erlaubt die Auftrennung von Proteinen mit einer Molekulargewichtsmasse unter 20.000 Dalton [74]. Zum Nachweis der L-Asparaginase-Fragmente nach Abtrennung des GST-Proteins wurde entsprechend ihrer geringen Größe ein 18%iges Trenngel verwendet. Im Gegensatz zur Laemmli-Methode wurden zwei verschiedene Elektrodenpuffer benützt. Als Molekularmassenmarker diente SeeBlue® Plus2 Prestained Ladder.

Kathoden-Puffer

pH 8,25

0,1 M	Tris-HCl
0,1 M	Tricin
0,1 % (w/v)	SDS

Anoden-Puffer

pH 8,9

0,2 M	Tris-HCl
-------	----------

3.4 IMMUNOLOGISCHE METHODEN

3.4.1 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern unter Einsatz eines epitop-spezifischen ELISA

Enzyme-linked immuno sorbent assays (ELISA) dienen dem spezifischen Nachweis von Antikörpern gegen ein Antigen. Der Einsatz dieses epitopspezifischen ELISA unterscheidet sich von den Standardverfahren insofern, dass als Antigen nicht das gesamte L-Asparaginase-Protein, sondern Fragmente, exprimiert als GST-Fusionsproteine, eingesetzt wurden. In separaten Versuchen wurden zudem die L-Asparaginase-Proteinfragmente ohne GST-Anteil verwendet.

Die Immobilisierung des Antigens erfolgt auf einer Mikrotiterplatte, welche in ihren 96 Vertiefungen das Antigen an der Kunststoffoberfläche bindet. Nach Inkubation mit Patientenserum werden die ungebundenen Antikörper ausgewaschen und ein Peroxidase-konjugierter Anti-Human IgG zugegeben. Dieser bindet spezifisch an den Fc-Teil des humanen Antikörpers. Nach Zugabe des Farbstoffes ABTS wird der Umsatz photometrisch bei 405_{nm} gemessen. Die Menge des Farbstoffumsatzes ist proportional zu der Menge im Serum befindlicher Antikörper. Abbildung 12 veranschaulicht das Prinzip des ELISA.

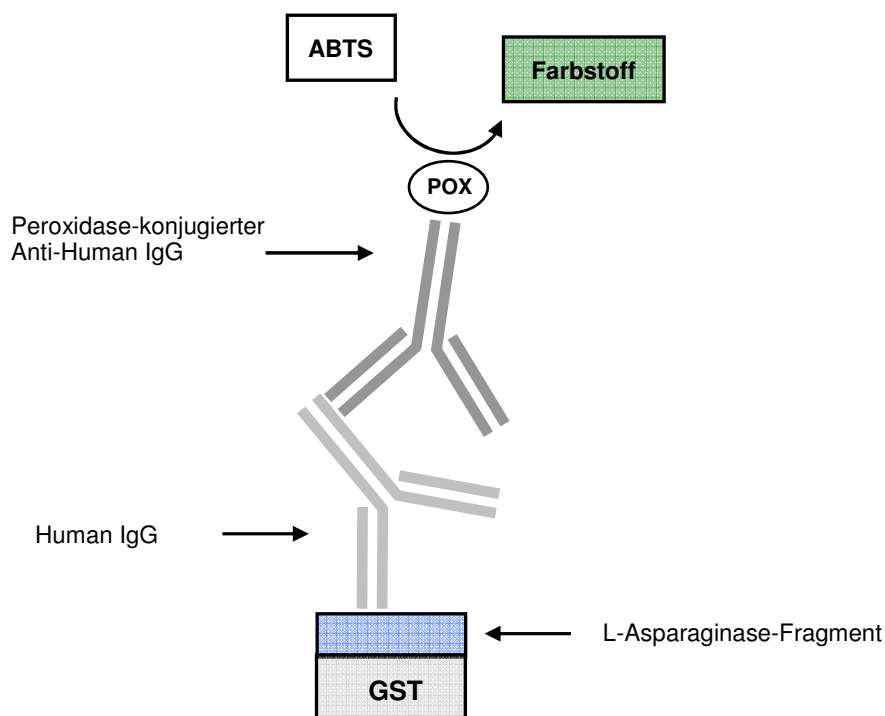


Abb. 12: Schematischer Aufbau des GST-Fusionsproteins ELISA

96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 100 µl der sechs GST-Fusionsproteine, zuvor 1:50 mit Carbonatpuffer auf eine Endkonzentration von 10 µg/ml verdünnt, gecoatet. Zudem wurde das GST-Protein ohne zusätzliche L-Aparaginasesequenz ebenfalls in einer Konzentration von 10 µg/ml zur Kontrolle mitgeführt.

Carbonat-Puffer	pH 9,6
0,1 M NaHCO ₃	

Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit je 250 µl 0,05% Tween 20 in PBS-Puffer wurden unspezifische Bindungsstellen mit je 200 µl 1% BSA-Lösung geblockt und bei 4 °C über 3 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang mit PBS-Puffer wurden je Vertiefung 100 µl des Patientenserums, 1:200 in 1% BSA verdünnt, in einer Zweifach-Bestimmung pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Material wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und ein Peroxidase-konjugierter Anti-Human IgG Sekundärantikörper in einer 1:10.000 Verdünnung in PBS mit je 100 µl aufgetragen. Nach Inkubation über 1 Stunde bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen wurden 100 µl einer Raumtemperatur warmen ABTS-Lösung hinzugegeben und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Exakt nach 30 Minuten wurde die optische Dichte bei 405 nm in einem automatischen Lesegerät gemessen. Eine quantitative Bestimmung der Antikörperkonzentration in den Serumproben anhand eines bekannten Standards erfolgte nicht, so dass ein Antikörpertiter im eigentlichen Sinne nicht bestimmt wurde.

PBS-Tween-Puffer	pH 7,2
150 mM NaCl	
8 mM Na ₂ HPO ₄	
2 mM NaH ₂ PO ₄	
0,05 % Tween 20	

Zusätzlich zu den GST-Fusionsproteinen und dem GST-Protein ohne Fragment wurde das *E. coli* L-Asparaginase-Gesamtprotein (Asparaginase medac) als Antigen auf derselben Mikrotiterplatte eingesetzt. Das Coating wurde ebenfalls in einer Konzentration von 10 µg/ml durchgeführt. Abweichend waren die Verdünnung des Patientenserums mit 1:3.200 und des Sekundärantikörpers mit 1:20.000. Diese Konzentrationen waren in Vorversuchen ermittelt worden.

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität wurde eine aliquotierte Serumprobe als Kontrolle auf allen Mikrotiterplatten mitgeführt.

ERGEBNISSE

4.1 Herstellung der GST-Fusionsproteine

Um L-Asparaginase-Fragmente als Antigene in einem ELISA einzusetzen, wurden Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine hergestellt. Die Fusionsproteine umfassten außer dem GST-Anteil unterschiedlich lange Aminosäuresequenzen des L-Asparaginase-Proteins.

Die Auswahl dieser DNA-Sequenzen erfolgte auf der Grundlage vorangegangener Arbeiten zum experimentellen „Epitop-Mapping“ der *E. coli* L-Asparaginase [87]. Die verwendeten Teilsequenzen in Bezug auf eine Untereinheit des Enzyms sind in Abbildung 13 verdeutlicht.

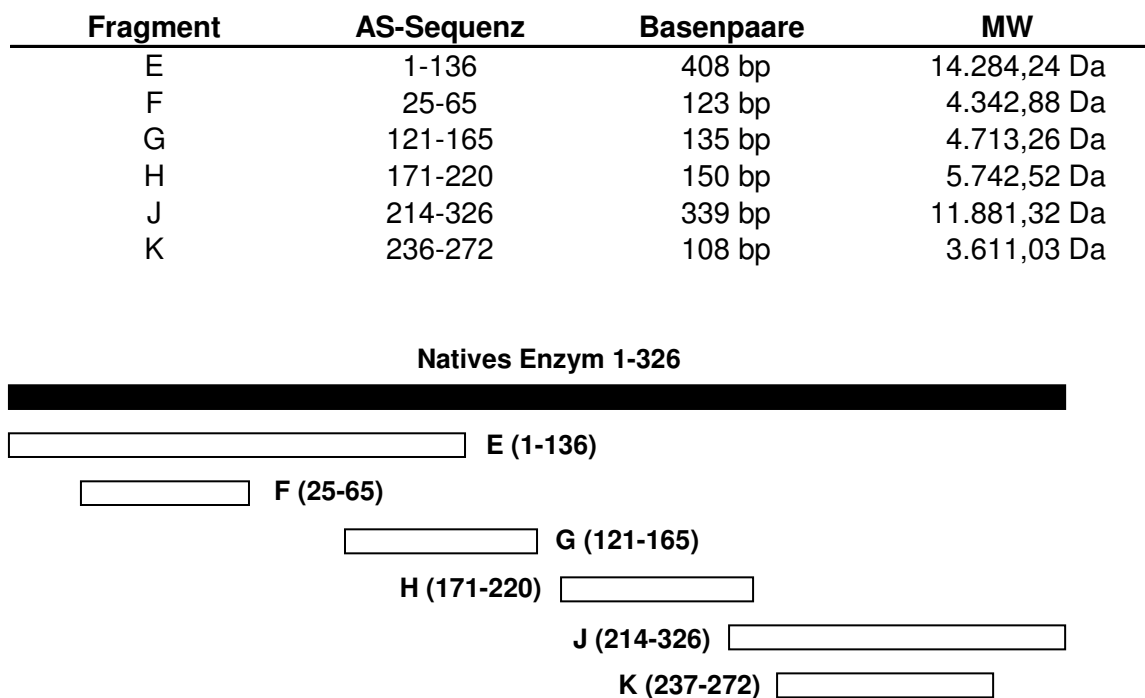


Abb. 13: Länge der L-Asparaginase-Fragmente bezogen auf eine Untereinheit des Enzyms

Als Template diente die DNA der nativen *E. coli* L-Asparaginase (Asparaginase medac). Nach Amplifikation der gewünschten Sequenzen mittels PCR erfolgte die Klonierung in den Vektor pGEX-6P-3. Die notwendigen Schnittstellen wurden durch die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* erzeugt und die jeweilige DNA-Sequenz inseriert. Abbildung 14 zeigt die Analyse der Fragmente im Agarosegel mit den erwarteten Fragmentgrößen von E (408 bp), F (123 bp), G (135 bp), H (150 bp), J (339 bp) und K (108 bp).

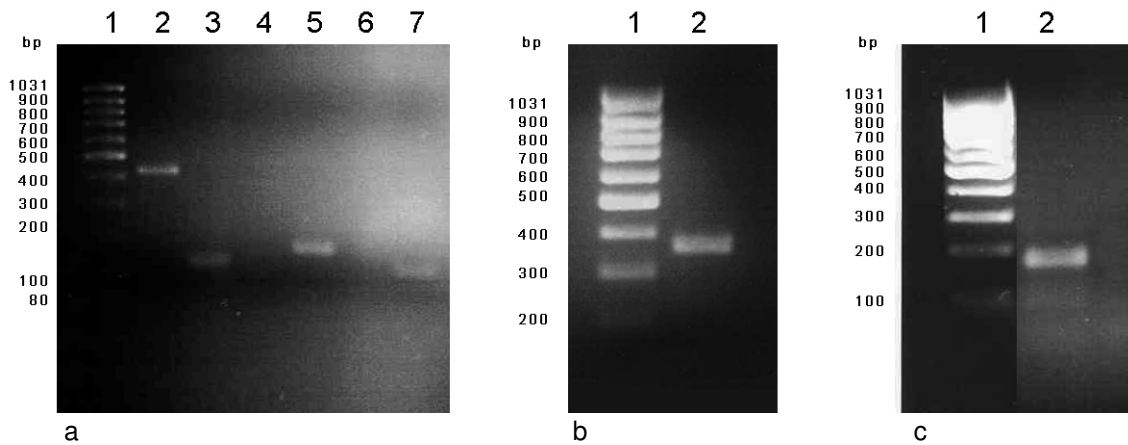


Abb. 14: Restriktionsanalyse der klonierten Fragment-DNA **a** 1: DNA-Längenstandard; 2: Fragment E; 3: Fragment F; 4: Fragment G; 5: Fragment H; 6: Fragment J; 7: Fragment K ; **b** 1: DNA-Längenstandard; 2: Fragment J; **c** 1: DNA-Längenstandard; 2: Fragment G

4.2 Expression der GST-Fusionsproteine

Die L-Asparaginase-Fragmente wurden in *E. coli* BL21 Zellen als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase exprimiert. Die Kontrolle der Expression erfolgte über eine elektrophoretische Auftrennung in der SDS-PAGE. Abbildung 15 zeigt das mit Coomassie gefärbte Gelbild.

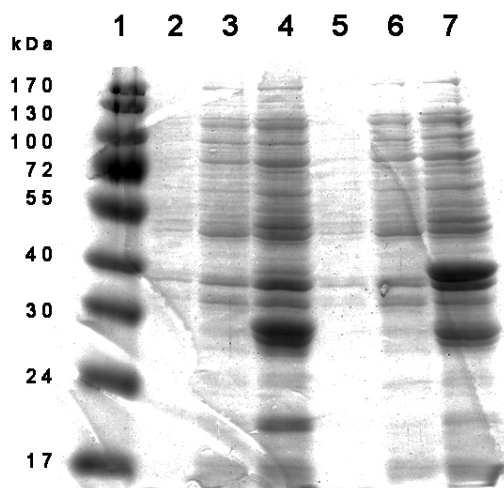


Abb. 15: Kontrolle der Expressionsschritte im SDS-PAGE von GST-Fusionsprotein H und E 1: Molekulargewichtsstandard; 2: Kulturlösung H vor Expression; 3: Kulturlösung H nach Expression; 4: Kulturlösung H 4 Stunden nach Induktion mit IPTG; 5: Kulturlösung E vor Expression; 6: Kulturlösung E nach Expression; 7: Kulturlösung E 4 Stunden nach Induktion mit IPTG

4.3 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Unter Einsatz der Affinitätschromatographie wurden die GST-Fusionsproteine aufgereinigt. Abbildung 16 zeigt die typische Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins durch Gebrauch eines automatischen Chromatographiesystems. Daneben ist die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins J dargestellt. Je nach Fusionsprotein konnten aus 500 ml LB-Kultur zwischen 0,5 und 5,0 mg Protein gewonnen werden.

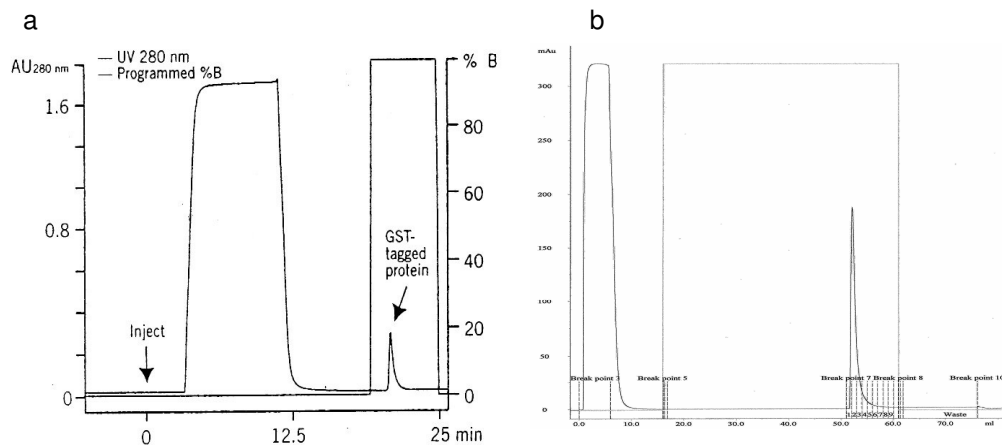


Abb.16: **a** Beispielhafte Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins (aus GST Gene Fusion Handbook, Amersham Biosciences), **b** Aufreinigung des GST-Fusionsproteins J

Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine besaßen Molekulargewichte von ca. 43.300 Da (E), 33.300 Da (F), 33.700 Da (G), 34.700 Da (H), 40.900 Da (J) und 32.600 Da (K). Diese entsprachen den rechnerisch ermittelten Werten aus dem GST-Anteil (29.000 Da) und den Fragmentgrößen (siehe auch Abbildung 13). Abbildung 17 zeigt die Banden der GST-Fusionsproteine in der erwarteten Höhe; als Kontrolle diente das GST-Protein ohne inseriertes Fragment.

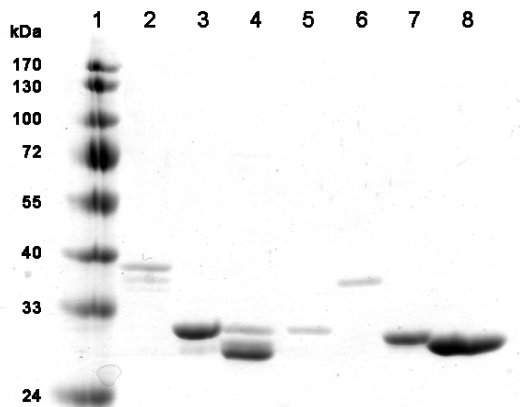


Abb. 17: **a** Kontrolle der Aufreinigung im SDS-PAGE der GST-Fusionsproteine E-K **1:** Molekulargewichtsmarker; **2:** E; **3:** F; **4:** G; **5:** H; **6:** J; **7:** K; **8:** GST ohne inseriertes Fragment

4.4 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern

Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden schließlich als Antigene in einem ELISA eingesetzt. Da aus vorhergehenden Untersuchungen bekannt war, dass bei einigen Patienten eine teilweise hohe Bindung von Antikörpern an den GST-Anteil zu beobachten war, wurde zur Kontrolle auf jeder Mikrotiterplatte der GST-Anteil ohne zusätzliches L-Asparaginase-Fragment mitgeführt. Ferner wurde, um einen Vergleich mit den international publizierten Methoden der Antikörper-Messung zu ermöglichen, die Antikörper-Bindung an das L-Asparaginase-Gesamtprotein gemessen. Eine von Wang et al. veröffentlichte Methode wurde zu diesem Zweck in modifizierter Form aufgebaut [84].

Zum Screening von Patientenseren auf Antikörper-Bindung standen uns aufgrund einer Kooperation mit der skandinavischen Studiengruppe Serumproben von pädiatrischen Patienten aus der NOPHO-ALL 2000 Studie zur Verfügung.

Da in diesem Kollektiv wenige klinische Reaktionen, sondern häufig eine „stille Inaktivierung“ der Enzymaktivität zu beobachten waren, wurde die Messung der Antikörpertiter vor allem im Hinblick auf das Erkennen eines spezifischen Antikörpermusters für diese Patientensubgruppe durchgeführt.

Für den Aufbau der ELISA-Methode wurden daher Seren von Patienten mit einem rapiden Abfall der Enzymaktivität ausgewählt. Diese Seren wurden als positive Referenz für die Festlegung der Verdünnungsstufen der Seren und Anti-Human IgG-Lösung (Sekundärantikörperlösung) sowie Bestimmung der optimalen Coating-Konzentration der Mikrotiterplatte für die GST-Fusionsproteine und das L-Asparaginase-Gesamtprotein verwendet. Anti-*E.coli*-Asparaginase-Antikörper aus Kaninchenserum kamen in den Vorversuchen nicht zum Einsatz, da das Antiserum keine Aussage darüber zulässt, ob diese Antikörper eine Reaktion in Form einer „stillen Inaktivierung“ und/oder klinischen Hypersensitivitätsreaktion ausgelöst hätten.

Als Negativkontrolle wurden Seren von freiwilligen Probanden ohne vorherigen Kontakt mit L-Asparaginase verwendet.

Eine quantitative Bestimmung der Antikörperkonzentration in den Serumproben wurde nicht durchgeführt. Für die Messwerte der gemessenen optischen Dichte (O.D.) bei 405 nm wurde dennoch der Begriff des Antikörpertiters verwendet.

4.4.1 Messung von Anti-Asparaginase IgG (Kaninchen)

Neben den Patientenseren wurden Anti-*E.coli*-Asparaginase-Antikörper (IgG-Fraktion) aus Kaninchenserum im ELISA eingesetzt. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse mit einer Bindung von Antikörpern vorwiegend an die GST-Fusionsproteine E und J. Zum Vergleich ist der Antikörpertiter des L-Asparaginase-Gesamtproteins mit in die Abbildung aufgenommen.

Die Messwerte für GST unterscheiden sich kaum vom Leerwert (kein Antigen-Coating). Dies zeigt, dass im kommerziell erhältlichen Antiserum keine relevante Konzentration von gegen GST gerichteten Antikörpern vorhanden ist. Im Patientenkollektiv konnte demgegenüber bei einigen Proben eine beträchtliche Bindung an den GST-Anteil beobachtet werden.

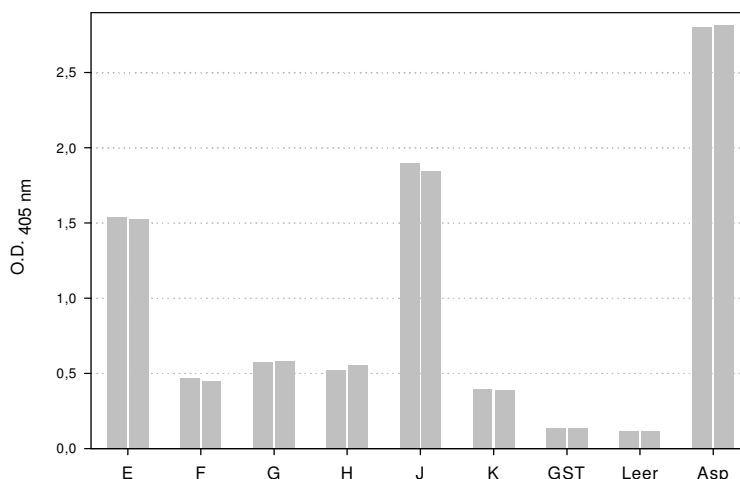


Abb. 18: Antikörpertiter eines Anti-Asparaginase IgG (Kaninchen) in einer Serumverdünnung von 1:800 gegen die einzelnen GST-Fusionsproteine (E-K), GST ohne Insert, Leer: ohne Antigenzusatz und L-Asparaginase-Gesamtprotein (Asp) in einer Doppelbestimmung

4.4.2 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern in Patientenseren

Von 42 in der Auswertung berücksichtigten Patienten wiesen 19 während ihres Behandlungsverlaufs einen vorzeitigen Abfall der Enzymaktivität auf, so dass diese der Gruppe der „stillen Inaktivierung“ zugeordnet wurden. Als Merkmal diente dabei ein Abfall der L-Asparaginase-Serumaktivität ≤ 100 U/ml innerhalb von zwei Wochen nach Applikation (siehe auch 5.3) in allen zur Verfügung stehenden Serumproben. Bei den übrigen 23 Patienten verhielt sich die Enzymaktivität im gewünschten therapeutischen Bereich. Das bedeutete eine L-Asparaginase-Serumaktivität ≥ 100 U/ml innerhalb von

zwei Wochen nach der letzten Applikation. Zur Kontrolle dienten 14 Seren von freiwilligen Probanden ohne vorherigen Kontakt mit dem L-Asparaginase-Protein.

Abbildungen 19 und 20 zeigen den Verlauf der Antikörpertiter gegen die sechs GST-Fusionsproteine E-K und das Gesamtprotein für die Gruppe der Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität und „stiller Inaktivierung“. Dargestellt ist der Median, gebildet aus den jeweils letzten verfügbaren Serumproben aus der Induktions- sowie Reinduktionsphase.

Patienten mit Serumaktivität der L-Asparaginase im gewünschten therapeutischen Bereich zeigten einen nahezu konstanten Verlauf der Antikörpertiter von Induktion zur Reinduktion. Wie in Tabelle 4-6 dargestellt, veränderte sich der Titer Median für das Fusionsprotein E von 0,377 in der Induktion auf 0,336 Reinduktion (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,1401$) respektive für F von 0,223 auf 0,184 ($p = 0,3967$), für G von 0,229 auf 0,229 ($p = 0,4326$), für H von 0,286 auf 0,267 ($p = 0,3823$), für J von 0,431 auf 0,433 ($p = 0,3305$), für K von 0,218 auf 0,226 ($p = 0,1981$) und für das Gesamtprotein von 0,104 auf 0,106 ($p = 0,2329$).

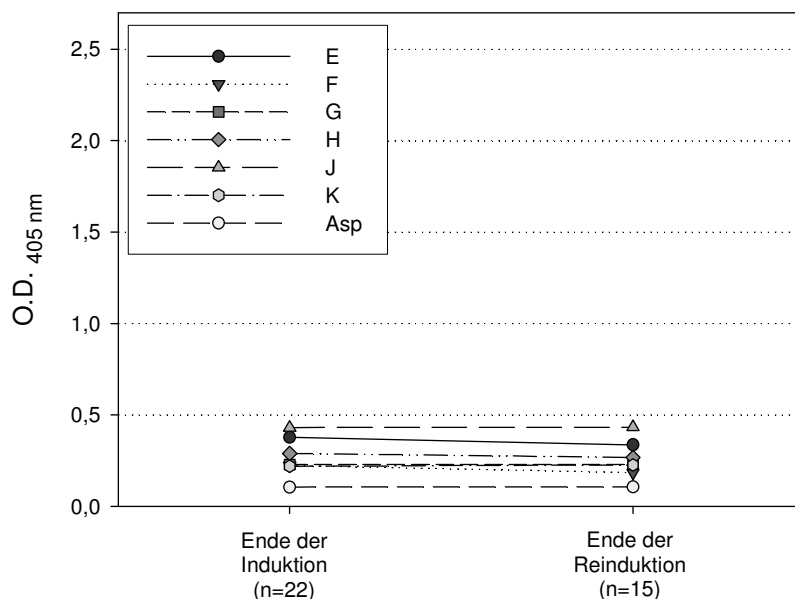


Abb. 19: Median der Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine (E-K) und das Gesamtprotein (Asp) der jeweils letzten Probe aus Induktion (n=22) und Reinduktion (n=15) für Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität (n=23)

Für die Patienten mit „stiller Inaktivierung“ ließ sich ein Anstieg der Antikörperkonzentration vorwiegend gegen die GST-Fusionsproteine E und J sowie das Gesamtprotein beobachten. Der Median des Antikörpertiters gegen das Fusionsprotein E stieg von 0,621 in der Induktion um 1,134 auf 1,755 in der Reinduktion (Mann-Whitney-U-Test,

$p = 0,0023$); für Fusionsprotein J von 0,597 um 0,468 auf 1,065 ($p = 0,0494$) und für das Gesamtprotein von 0,130 um 2,415 auf 2,545 ($p = 0,0005$). Der Median der übrigen Fusionsproteine veränderte sich nur gering; respektive für F von 0,229 auf 0,330 ($p = 0,1705$), für G von 0,262 auf 0,316 ($p = 0,3259$), für H von 0,340 auf 0,333 ($p = 0,5695$) und für K von 0,251 auf 0,267 ($p = 0,4080$).

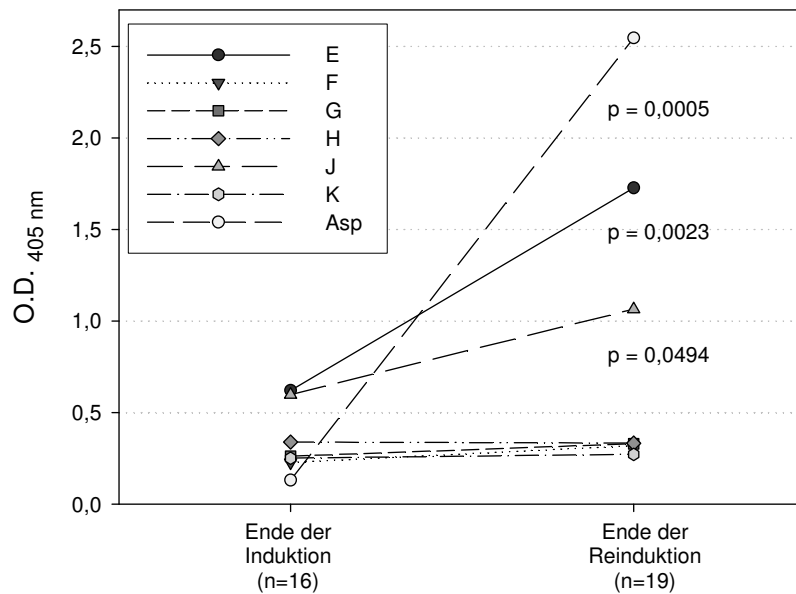


Abb. 20: Median der Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine (E-K) und das Gesamtprotein (Asp) der jeweils letzten Probe aus Induktion (n=16) und Reinduktion (n=19) für Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (n=19)

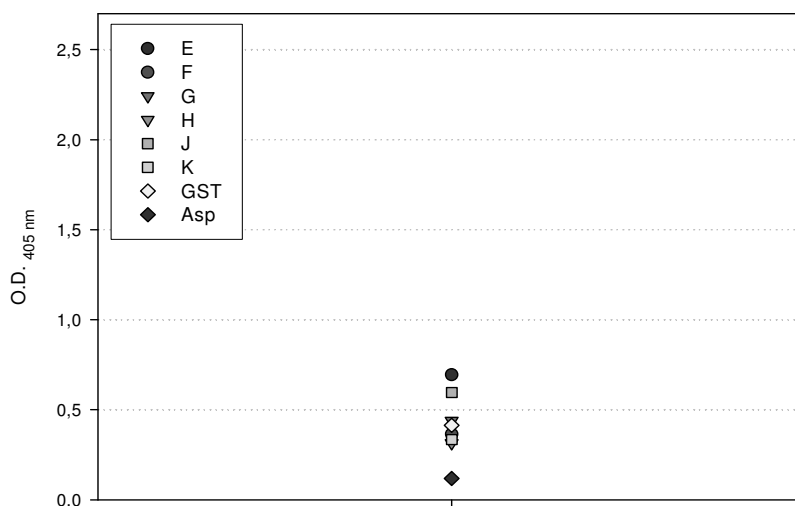


Abb. 21: Median der Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp) für die Kontrollproben (n=14)

In Abbildung 21 ist der Median der Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine und das Gesamtprotein für die Gruppe der Kontrollproben von Probanden ohne vorausgegan-

gene L-Asparaginase-Exposition graphisch dargestellt. Innerhalb dieser Gruppe zeigte sich eine hohe Bindung von Antikörpern an den GST-Anteil. Dies drückt sich darin aus, dass der Median des GST-Titers über den Werten der Titer gegen die Fusionsproteine F, H und K liegt. Herausgegriffen ist in Abbildung 22 die Kontrollprobe Nr. 4 mit hohen Antikörpertitern gegen die Fusionsproteine E und J.

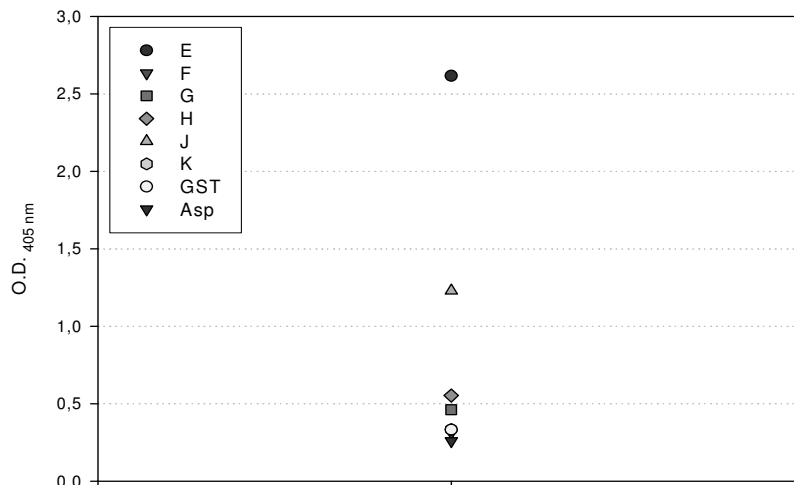


Abb. 22 : Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp) für Kontrollprobe Nr. 4

Kontrollprobe 4 ohne vorherige L-Asparaginase-Exposition zeigte eine deutliche Bindung von Antikörpern an Fusionsprotein E und J.

Beispielhaft für die übrigen Patienten sind im Folgenden die Antikörpertiter von vier verschiedenen Patientenseren herausgestellt.

Die Patienten 37 und 74 zeigen in den Abbildungen 23 und 24 das charakteristische Antikörpermuster von Proben mit einer „stillen Inaktivierung“. Im Serum waren vorrangig Antikörper gegen die GST-Fusionsproteine E und J vorhanden, während an die restlichen Proteine eine nur geringe Bindung nachweisbar war. Im Behandlungsverlauf stieg die Antikörperbindung mit einem Maximum zum Ende der Reinduktionsphase (Protokolltage 1-15) an. Parallel dazu fiel die Enzymaktivität unterhalb des erwünschten therapeutischen Bereichs von ≥ 100 U/ml. Im Insert ist die Aktivität der L-Asparaginase im Serum im zeitlichen Verlauf der Therapie dargestellt. Die Protokolltage 37-47 entsprechen der Induktionsphase; Protokolltage 1-15 der Reinduktionsphase, in welcher nach einem Abstand von etwa 12 Wochen ein erneuter therapeutischer Kontakt mit L-Asparaginase stattfindet. Der Antikörpertiter gegen das Gesamtprotein stieg parallel mit den Titern gegen die Fusionsproteine an.

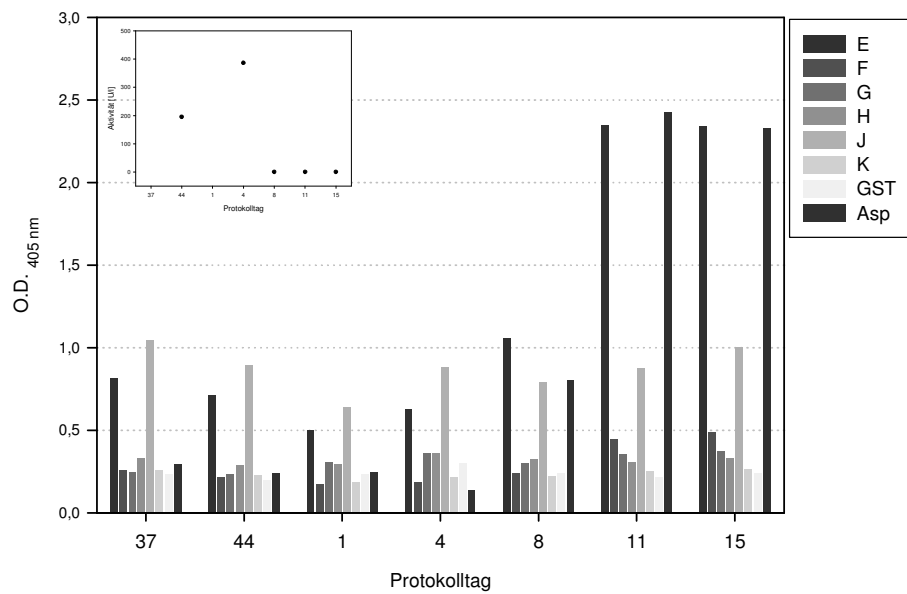


Abb. 23: Antikörpertiter von Patient 37 mit „stiller Inaktivierung“; im Insert ist die Serumaktivität der L-Asparaginase im zeitlichen Verlauf dargestellt

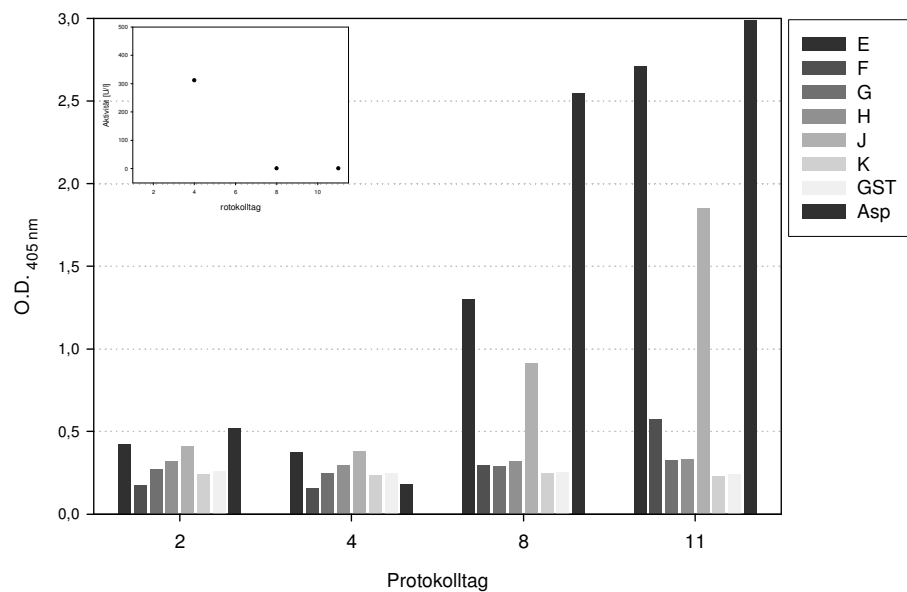


Abb. 24: Antikörpertiter von Patient 74 mit „stiller Inaktivierung“; Proben mit einer O.D. $_{405\text{nm}} > 3,0$ wurden durch stärkere Verdünnung bestimmt; im Insert ist die Serumaktivität der L-Asparaginase im zeitlichen Verlauf dargestellt

Man kann aus Abbildung 25 erkennen, dass im Serum des Patienten 149 keine Antikörperbindung an die GST-Fusionsproteine oder das Gesamtprotein vorlag. Das Ergebnis korreliert mit einer Serumaktivität von L-Asparaginase im therapeutischen Bereich über den gesamten Behandlungszeitraum.

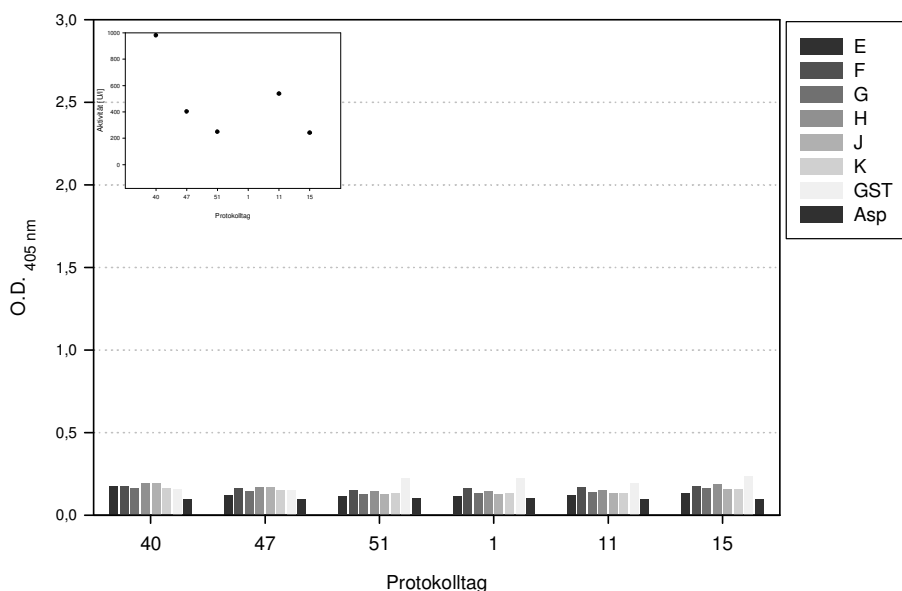


Abb. 25: Antikörpertiter von Patient 149 mit Enzymaktivität im therapeutischen Bereich; im Insert ist die Serumaktivität der L-Asparaginase im zeitlichen Verlauf dargestellt

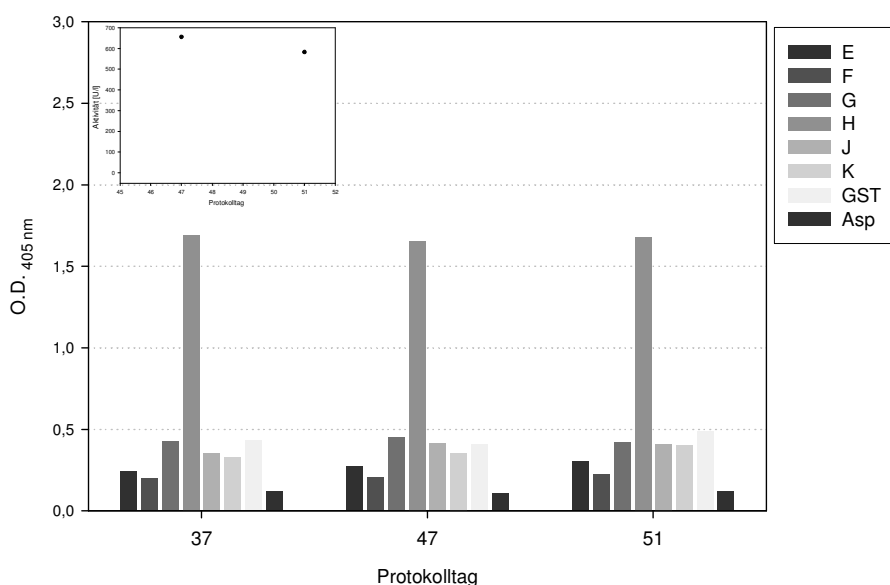


Abb. 26: Antikörpertiter von Patient 140 mit Enzymaktivität im therapeutischen Bereich; im Insert ist die Serumaktivität der L-Asparaginase im zeitlichen Verlauf dargestellt

Auch Patient 140 zeigt in Abbildung 26 eine Enzymaktivität im therapeutischen Bereich. Im Serum des Patienten ließ sich bereits in der Induktion ein hoher Titer gegen das GST-Fusionsprotein H nachweisen. Die Antikörperformation gegen eine antigene Struktur des Fusionsproteins H führte jedoch zu keinem Abfall der enzymatischen Aktivität der L-Asparaginase. Ferner konnte keine klinische Reaktion beobachtet werden.

Eine zusammenfassende Illustration der fragmentspezifischen Antikörpertiter für alle Patienten mit „stiller Inaktivierung“ zeigt Abbildung 27. Für jedes GST-Fusionsprotein ist der Verlauf der Antikörpertiter von der Induktions- zur Reinduktionsphase graphisch dargestellt. Die Linien verbinden jeweils die Einzelwerte eines Patienten aus der letzten verfügbaren Serumprobe aus der Induktions- und Reinduktionsphase.

Proben mit einer Absorption ($\text{O.D.}_{405\text{ nm}} > 4,0$) wurden in einer stärkeren Serumverdünnung gemessen. Um einen Titerabfall nicht vorzutäuschen, wurden die in weiteren Verdünnungsschritten bestimmten Werte nicht in die Graphik mit aufgenommen. Ferner muss beachtet werden, dass nicht von jedem Patienten ausreichend Serumproben aus der Induktion und Reinduktion vorlagen. Die Anzahl der Proben in Induktion sowie Reinduktion war somit nicht identisch.

Die Verläufe der Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine F, G, H und K waren bei der Mehrzahl der Patienten weitestgehend konstant. Der ausgeprägte Anstieg eines Titers gegen Fusionsprotein F war durch einen Patienten mit raschem Abfall der Aktivität bedingt, der gegen die Fusionsproteine E und F ungewöhnlich hohe Antikörpermengen bildete. Ein weiterer Patient mit „stiller Inaktivierung“ verursachte die Titeranstiege gegen die Fusionsproteine G und H.

Im Vordergrund standen deutlich die Verläufe der Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E und J. Die Mehrzahl der Patienten mit „stiller Inaktivierung“ zeigte einen Anstieg der Antikörperkonzentration in der Reinduktion gegen eines oder beide Fragmente.

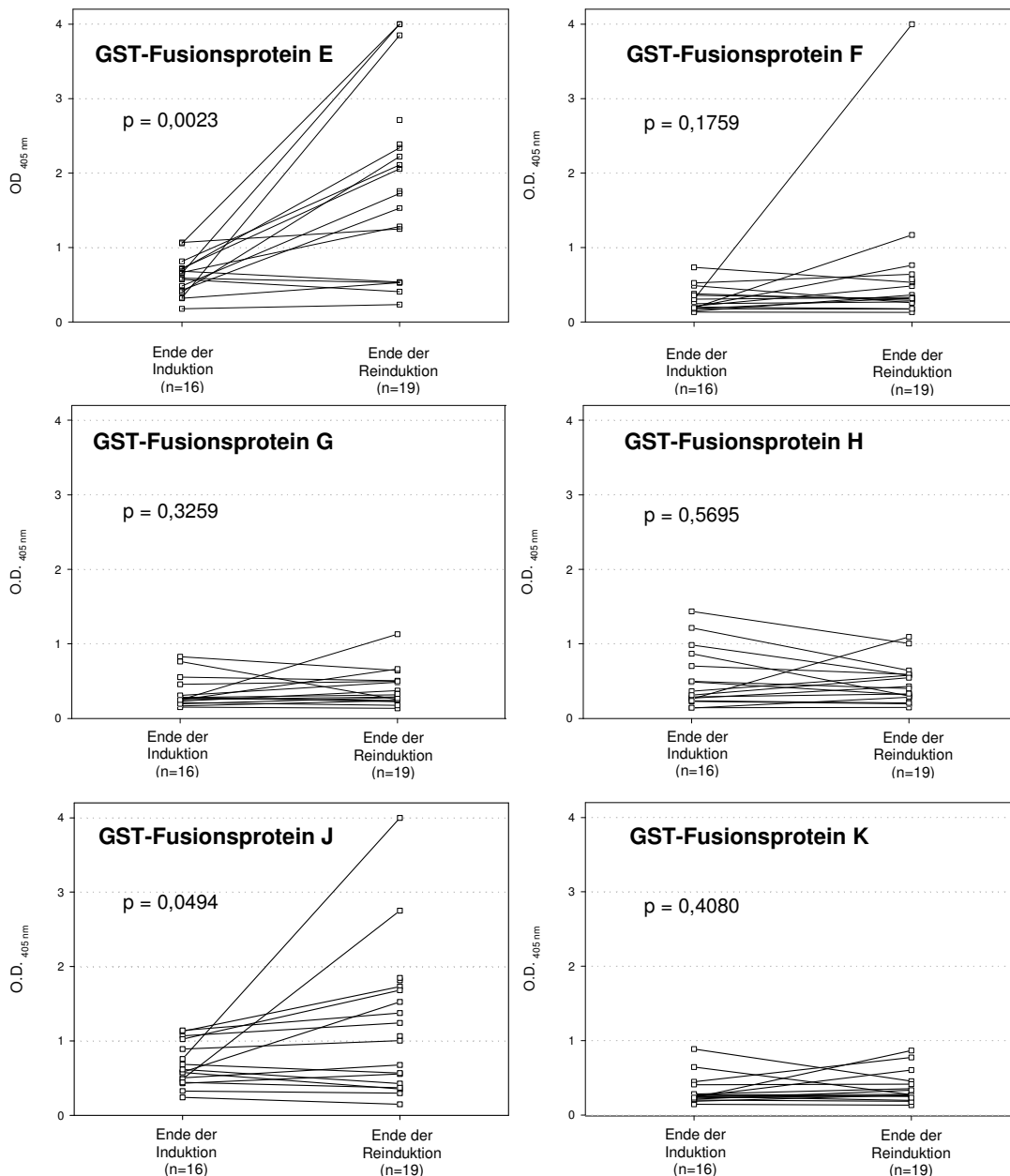


Abb. 27: Vergleich der Antikörpertiterverläufe gegen die GST-Fusionsproteine (E-K) für alle Patienten mit „stiller Inaktivierung“

In Form von Box Plots sind die Ergebnisse der Antikörpertiter-Messungen für die Patienten mit therapeutischer Aktivität und „stiller Inaktivierung“ sowie Kontrollproben in den Abbildungen 28 bis 30 dargestellt. Auch hier sind die letzten verfügbaren Proben aus der Induktion denjenigen aus der Reinduktionsphase gegenübergestellt. In die Darstellung mit aufgenommen ist auch der Antikörpertiter gegen das Gesamtprotein.

Die untere und obere Begrenzung der Box stellen jeweils das 25. und 75. Perzentil dar; innerhalb der Box sind damit die mittleren 50% der Werte enthalten. Der waagerechte Strich innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Fehlerbalken unter- und oberhalb

zeigen das 10. und 90. Perzentil an. Einzelwerte sind durch ein schwarzes Quadrat gekennzeichnet.

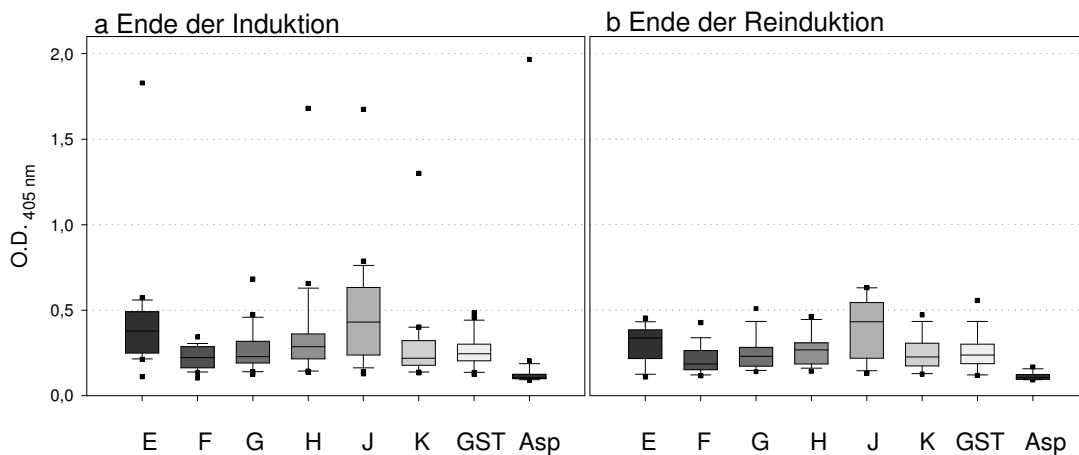


Abb. 28: Box Plots der GST-Fusionsproteine (E-K), GST und des Gesamtproteins (Asp) für die Patienten mit therapeutischer Aktivität (n=23). Gegenübergestellt sind die jeweils letzten verfügbaren Proben aus (a) Induktion (n=22) und (b) Reinduktion (n=15)

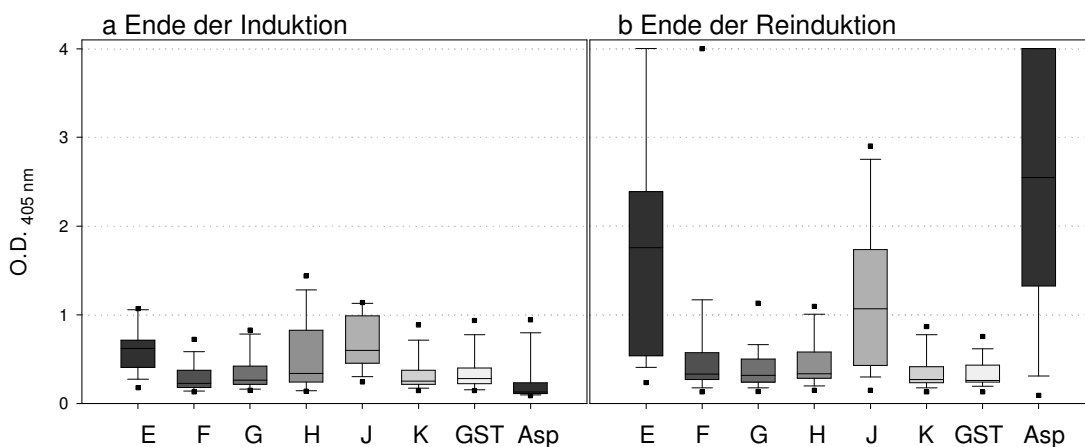


Abb. 29: Box Plots der GST-Fusionsproteine (E-K), GST und des Gesamtproteins (Asp) für die Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (n=19). Gegenübergestellt sind die jeweils letzten verfügbaren Proben aus (a) Induktion (n=16) und (b) Reinduktion (n=19)

In der Induktion konnten in der Gruppe der Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität vereinzelt hohe Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E, H, J und K sowie das Gesamtprotein gemessen werden. Die Messung der Antikörpertiter erfolgte dabei immer in der letzten verfügbaren Serumprobe aus dem betreffenden Therapieabschnitt. Für die Patienten, die hohe Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E, J, K und das Gesamtprotein verursachen, lagen keine Serumproben aus der Reinduktionsphase vor. Eine Auswirkung der fortgesetzten L-Asparaginase-Gabe durch eine mögliche Enzyminaktivierung bleibt ungeklärt.

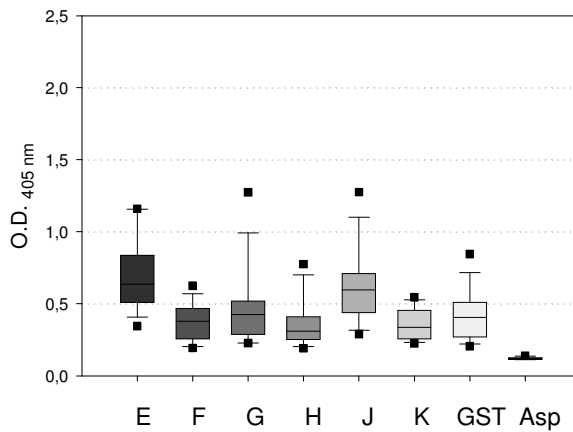


Abb. 30: Box Plots der GST-Fusionsproteine (E-K), GST und des Gesamtproteins (Asp) für die Kontrollproben (n=13); Kontrollprobe 4 ausgeschlossen

Induktion	Kontrolle vs. „stille Inaktivierung“	Kontrolle vs. therapeutische Aktivität	„stille Inaktivierung“ vs. therapeutische Aktivität
E	p = 0,1934	p = 0,0001	p = 0,0047
F	p = 0,0701	p = 0,0002	p = 0,1712
G	p = 0,0771	p = 0,0006	p = 0,2461
H	keine Signifikanz	keine Signifikanz	keine Signifikanz
J	p = 1,0000	p = 0,0450	p = 0,0334
K	p = 0,0701	p = 0,0025	p = 0,2276
Asp	p = 0,4726	p = 0,0487	p = 0,0334

Reinduktion	Kontrolle vs. „stille Inaktivierung“	Kontrolle vs. therapeutische Aktivität	„stille Inaktivierung“ vs. therapeutische Aktivität
E	p = 0,0139	p = 0,0000	p = 0,0000
F	p = 0,7601	p = 0,0002	p = 0,0003
G	p = 0,2707	p = 0,0009	p = 0,0227
H	p = 0,3972	p = 0,1023	p = 0,0100
J	p = 0,1227	p = 0,0043	p = 0,0016
K	p = 0,2869	p = 0,0023	p = 0,0709
Asp	p = 0,0000	p = 0,0091	p = 0,0000

Differenz Reinduktion - Induktion	„stille Inaktivierung“ vs. therapeutische Aktivität
E	p = 0,0007
F	p = 0,5249
G	p = 0,4984
H	p = 0,4232
J	p = 0,1011
K	p = 0,9510
Asp	p = 0,0000

Tabelle 3: Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests für den Vergleich der Kontrollgruppe, Gruppe der therapeutischen Aktivität und „stillen Inaktivierung“ für die GST-Fusionsproteine (E-K) und das Gesamtprotein (Asp)

Bis auf Fragment H gibt es signifikante Unterschiede in den Antikörperwerten der drei Gruppen (Kontrollgruppe, therapeutische Aktivität und „stille Inaktivierer“) sowohl am Ende der Induktion als auch Reinduktion. Für Fragment H konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Antikörpertitern für die Kontrollgruppe und „stillen Inaktivierer“ am Ende der Induktion nachgewiesen werden.

Patienten mit einer „stillen Inaktivierung“ bildeten signifikant mehr Antikörper gegen Fragment E und das Gesamtprotein als die Kontrollgruppe am Ende der Reinduktion.

Gegen das Fragment E sowie das L-Asparaginase-Gesamtprotein bildeten Patienten mit einer „stillen Inaktivierung“ signifikant mehr Antikörper vom Ende der Induktion zum Ende der Reinduktion als Patienten mit therapeutischer Aktivität.

Für die einzelnen Patientengruppen sowie die Kontrollgruppe sind in den Tabellen 4 bis 5 die Daten der Antikörpertiter (O.D. $_{405\text{ nm}}$) gegen die GST-Fusionsproteine, GST und das Gesamtprotein mit Median, Mittelwert und Standardabweichung aufgelistet.

Induktion (n=22)				Reinduktion (n=15)			
	Md	M	SD		Md	M	SD
E	0,377	0,429	0,336	E	0,336	0,308	0,103
F	0,223	0,219	0,067	F	0,184	0,208	0,080
G	0,229	0,271	0,131	G	0,229	0,248	0,102
H	0,286	0,362	0,321	H	0,267	0,277	0,094
J	0,431	0,485	0,330	J	0,433	0,390	0,171
K	0,218	0,286	0,241	K	0,226	0,243	0,100
GST	0,245	0,261	0,097	GST	0,238	0,252	0,110
Asp	0,104	0,198	0,396	Asp	0,106	0,113	0,023

Tabelle 4: Antikörpertiter (O.D. $_{405\text{ nm}}$) der Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität (n= 23) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp) aus den jeweils letzten verfügbaren Proben der Induktion (n=22) und Reinduktion (n=15)

Induktion (n=16)				Reinduktion (n=19)			
	Md	M	SD		Md	M	SD
E	0,621	0,600	0,249	E	1,755	1,865	1,190
F	0,229	0,297	0,164	F	0,330	0,612	0,857
G	0,262	0,341	0,205	G	0,316	0,388	0,233
H	0,340	0,527	0,400	H	0,333	0,449	0,258
J	0,597	0,681	0,289	J	1,065	1,175	0,810
K	0,251	0,322	0,194	K	0,267	0,344	0,201
GST	0,281	0,343	0,211	GST	0,255	0,323	0,160
Asp	0,130	0,239	0,246	Asp	2,545	2,571	1,394

Tabelle 5: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (n= 19) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp) aus den jeweils letzten verfügbaren Proben der Induktion (n=16) und Reinduktion (n=19)

	Md	M	SD
E	0,695	0,836	0,566
F	0,365	0,365	0,120
G	0,439	0,464	0,258
H	0,316	0,369	0,165
J	0,596	0,661	0,292
K	0,335	0,359	0,102
GST	0,383	0,430	0,166
Asp	0,119	0,130	0,038

Tabelle 6: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Kontrollgruppe (n=14) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp)

4.5 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern nach Abtrennung von GST

Da bei einigen Patienten eine zum Teil erhebliche Bindung von Antikörpern an den GST-Anteil der Fusionsproteine beobachtet werden konnte, wurden in separaten Ansätzen die L-Asparaginase-Proteinfragmente als Antigene eingesetzt. Die Abtrennung des GST-Proteins erfolgte dabei durch den Gebrauch einer „site-specific“-Protease, welche durch das Erkennen spezifischer Bindungsstellen zwischen GST und dem Fusionsprotein eine Abtrennung der Glutathion-S-Transferase (GST) ermöglichte.

Nach Abtrennung des GST-Anteils konnten ähnliche Antikörper-Muster wie bei den Messungen der GST-Fusionsproteine beobachtet werden. Abbildung 31 zeigt die Gegenüberstellung der Antikörper-Bindung an das jeweilige GST-Fusionsprotein (a) sowie die Bindung an die Fragmente ohne „GST-Insert“ (b).

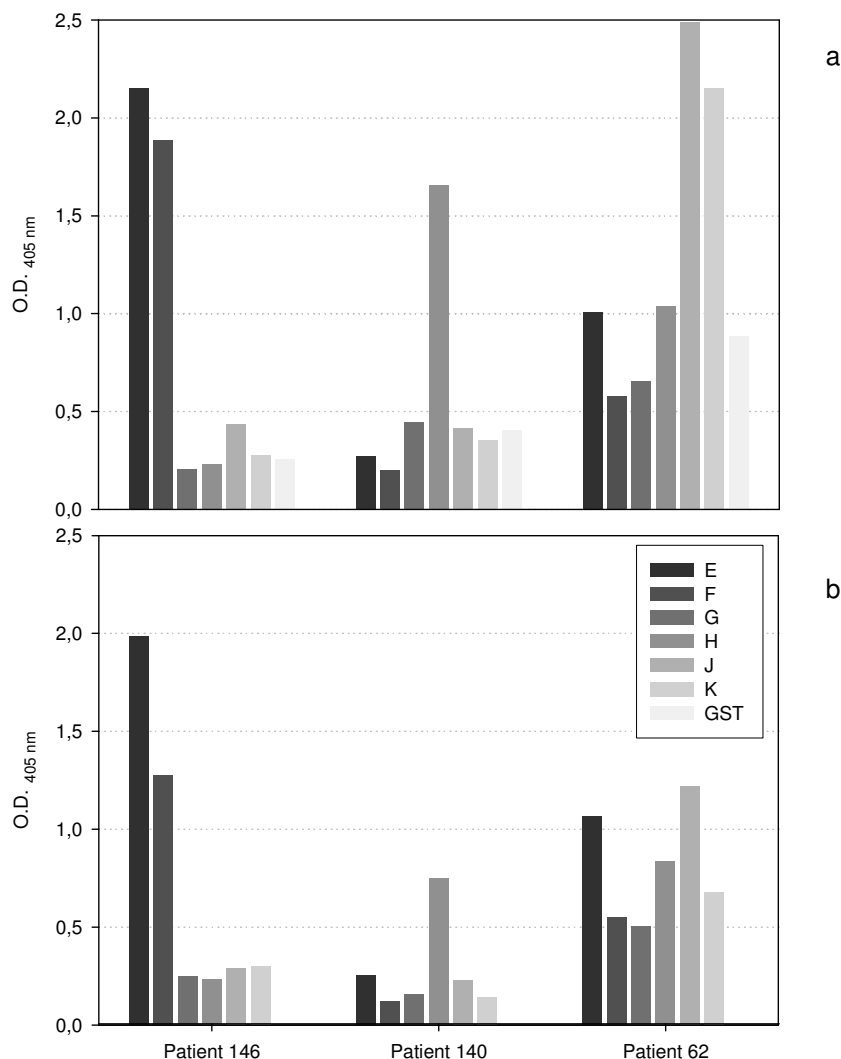


Abb. 31: Antikörpertiter von Patient 146, 140 und 62 gegen die einzelnen L-Asparaginase-Fragmente vor (a) und nach (b) Abtrennung des GST-Anteils durch eine „site-specific“-Protease

4.6 Bindung von Antikörpern an den GST-Anteil

Die Höhe des Antikörpertiters gegen GST unterschied sich innerhalb des Patientenkollektivs erheblich. Die O.D. _{405 nm} lag in einem Bereich zwischen 0,127 (Minimum) bis 0,935 (Maximum) mit einem Median von 0,263. Der Mittelwert lag bei 0,304 mit einer Standardabweichung von 0,141. Abbildung 32 zeigt die Häufigkeitsverteilung aller gemessenen Proben in einem Box Plot, in dem die untere und obere Begrenzung der Box das 25. bzw. 75. Perzentil darstellen. Der Strich in der Box entspricht dem Median. Fehlerbalken geben unterhalb und oberhalb der Box das 10. bzw. 90. Perzentil an; Einzelwerte sind durch ein schwarzes Quadrat gekennzeichnet.

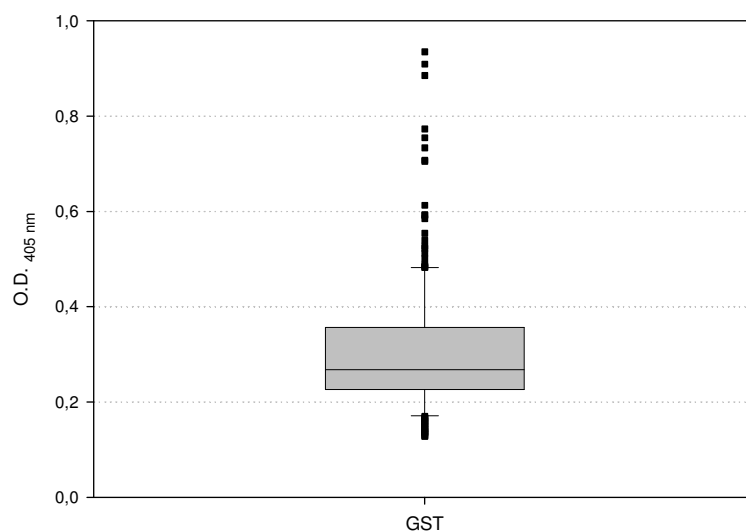


Abb. 32: Box-Plot des GST-Titers aller untersuchten Serumproben (n=220)

Im zeitlichen Behandlungsverlauf zeigte sich die Variation der GST-Titer Höhe beim einzelnen Patienten nur gering ausgeprägt. Ein initial niedriger Titer blieb im Verlauf niedrig, umgekehrt verhielt es sich bei Patienten mit hohem Titer. Abbildung 33 stellt den konstanten Verlauf des GST-Titers im Therapieverlauf bei einem ausgewählten Patienten dar.

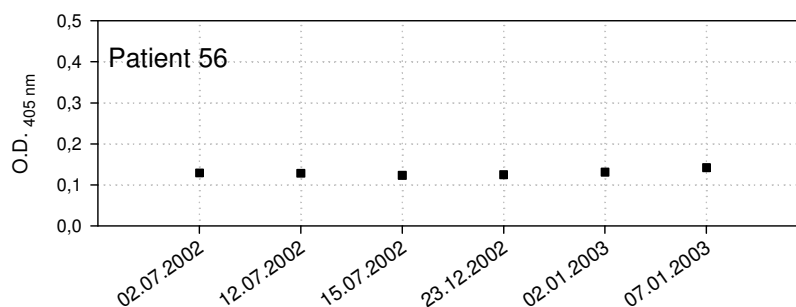


Abb. 33: Antikörpertiter gegen GST im zeitlichen Behandlungsverlauf von Patient 56

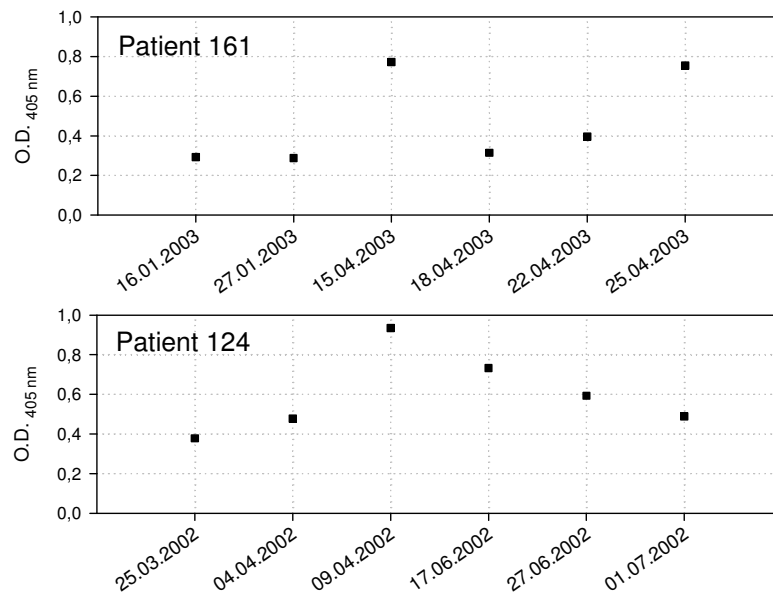


Abb. 34 : Antikörpertiter gegen GST im zeitlichen Behandlungsverlauf von Patient 161 und 124

Nur in wenigen Fällen wurden starke Schwankungen in der Höhe der GST-Antikörpertiter im zeitlichen Verlauf deutlich. Abbildung 34 zeigt beispielhaft den zeitlichen Titerverlauf während der Therapie bei zwei Patienten.

4.7 Messung von L-Asparaginase-Antikörpern bei Patienten mit einer Hypersensitivitätsreaktion

In weiteren Messungen wurden einige Seren von Patienten mit einer klinischen Hypersensitivitätsreaktion unterschiedlicher Ausprägung auf Bindung an die Fragmente untersucht. Da im zur Verfügung stehenden Kollektiv der NOPHO-ALL 2000 Studie Patienten mit starker klinischer Reaktion nur in geringer Anzahl vorhanden waren, wurde auf Proben aus der GMALL-Studie zurückgegriffen. Patient 485 litt nach Applikation unter Bronchospasmen, was zur Dosisreduktion auf 50% führte; Patient 669 wies ein Gesichtsexanthem auf.

Interessanterweise zeigten diese Patienten in Abbildung 35 sehr ungleichmäßig verteilte Antikörpertiter und wiesen zudem auch eine Bindung an die Fusionsproteine H und K auf. Der Titer gegen das Gesamtprotein war bei den gemessenen Proben mit Werten von 0,640, 0,088 und 0,110 vergleichsweise gering.

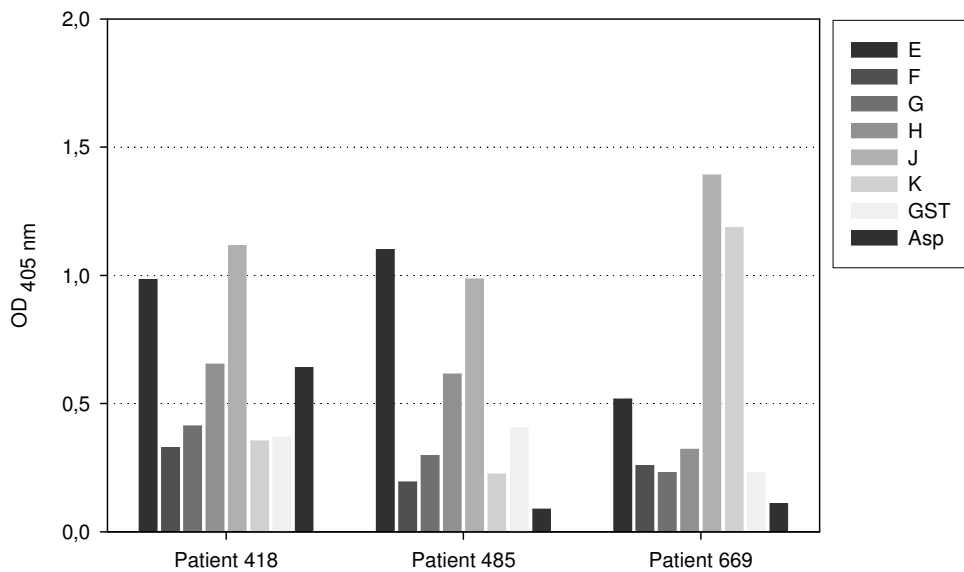


Abb. 35: Antikörpertiter von Patienten nach einer klinischen Hypersensitivitätsreaktion

4.8 Vergleich der Titer gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein mit den Titern gegen die GST-Fusionsproteine

Um eine Vergleichbarkeit unserer epitopspezifischen Methode mit den international eingesetzten Methoden zu ermöglichen, wurde jede Serumprobe auch auf Antikörper-Bindung an das Gesamtprotein untersucht. Für diese Messungen wurde ein von Wang et al. publizierter ELISA in modifizierter Form aufgebaut [84].

Abbildung 36 zeigt eine Häufigkeitsverteilung der Antikörpertiter gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein innerhalb der einzelnen Patientengruppen. Es ist ersichtlich, dass sich die Antikörpertiter der Kontrollproben gegen das Gesamtprotein von den Titern der Patienten mit therapeutischer Aktivität in Induktion und Reinduktion nur geringfügig unterscheiden. Dies belegt der Median von 0,119 für die Kontrollgruppe, 0,104 für die Gruppe mit therapeutischer Aktivität in der Induktion und 0,106 in der Reinduktion. Lediglich ein Patient mit therapeutischer Aktivität wies bereits am Ende der Induktion einen hohen Antikörpertiter auf. Serumproben aus der Reinduktionsphase lagen für diesen Patienten nicht vor.

In der Gruppe der „stillen Inaktivierung“ stieg der Antikörpertiter gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein an und war am Ende der Reinduktion signifikant höher als am Ende der Induktion (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $p = 0,005$).

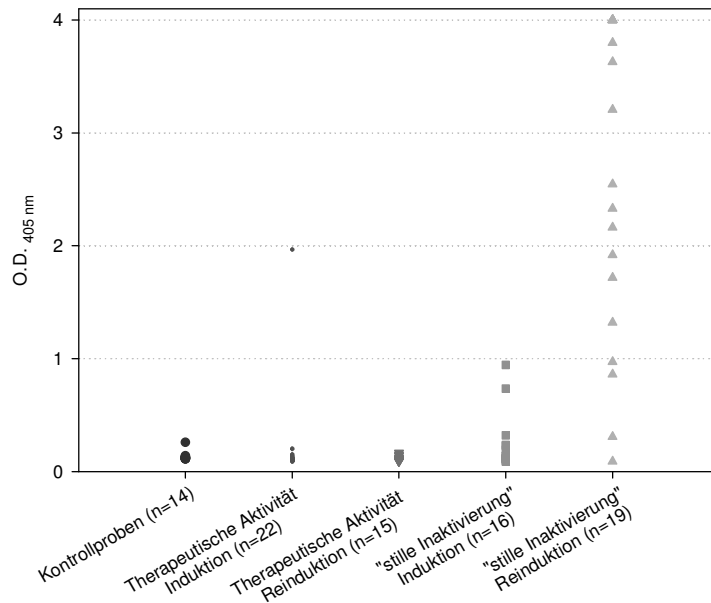


Abb. 36: Häufigkeitsverteilung der Titer gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein für die Kontrollgruppe, für Patienten mit therapeutischer Aktivität und „stiller Inaktivierung“ mit der jeweils letzten verfügbaren Probe aus Induktion und Reinduktion

Abbildungen 37 und 38 zeigen den Verlauf der Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E und J für die Gruppe der Patienten mit stiller Inaktivierung und therapeutischer Enzymaktivität jeweils den Antikörpertitern gegen das Gesamtprotein gegenübergestellt.

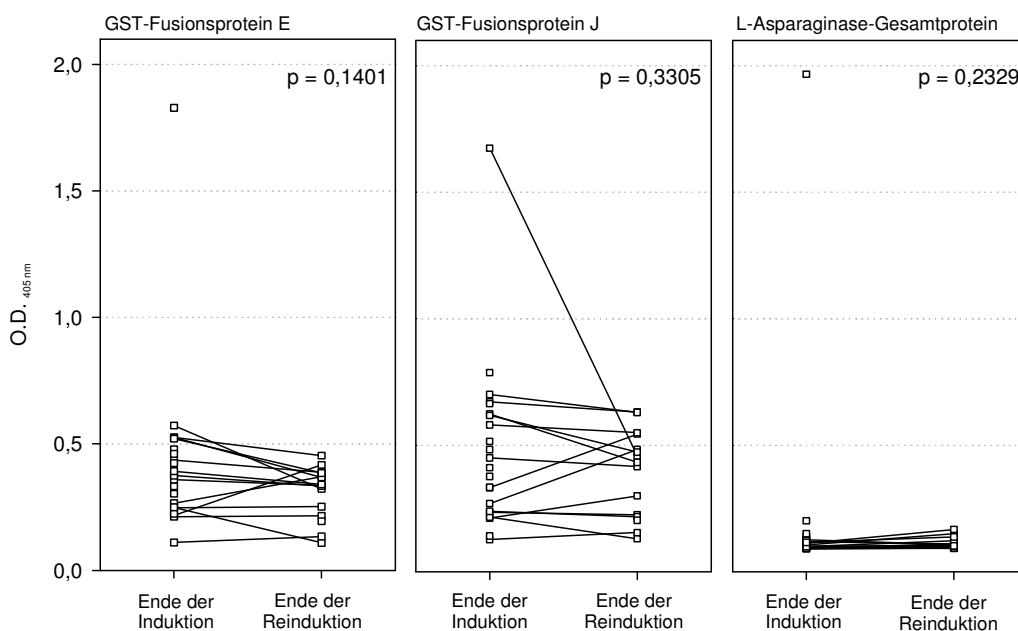


Abb. 37: Verlauf der Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E , J und das Gesamtprotein für die Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität (n=23). Gegenübergestellt sind jeweils die letzten verfügbaren Proben aus der Induktion (n=22) und Reinduktion (n=15)

Die hohen Antikörpertiter gegen Fusionsprotein E und das L-Asparaginase-Gesamtprotein am Ende der Induktion sind durch einen Patienten bedingt, von dem in der Reinduktion keine Serumproben zur Verfügung standen. Den Abfall des Antikörpertiters gegen Fusionsprotein J vom Ende der Induktion zum Ende der Reinduktion zeigte ein Patient ohne korrelierenden Abfall der Enzymaktivität.

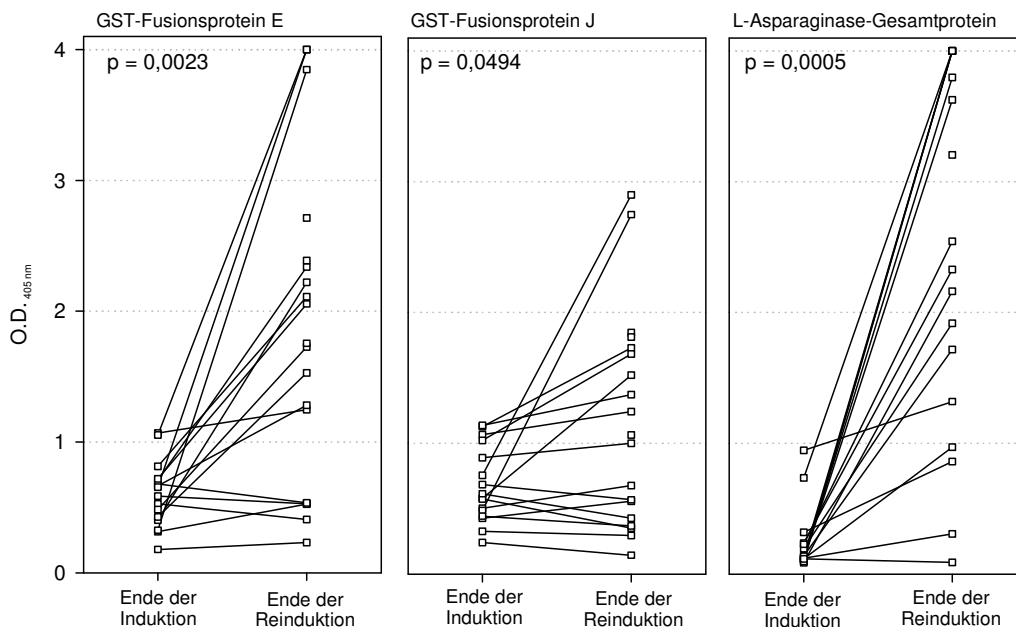


Abb. 38: Verlauf der Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E , J und das Gesamtprotein für die Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (n=19). Gegenübergestellt sind jeweils die letzten verfügbaren Proben aus der Induktion (n=16) und Reinduktion (n=19)

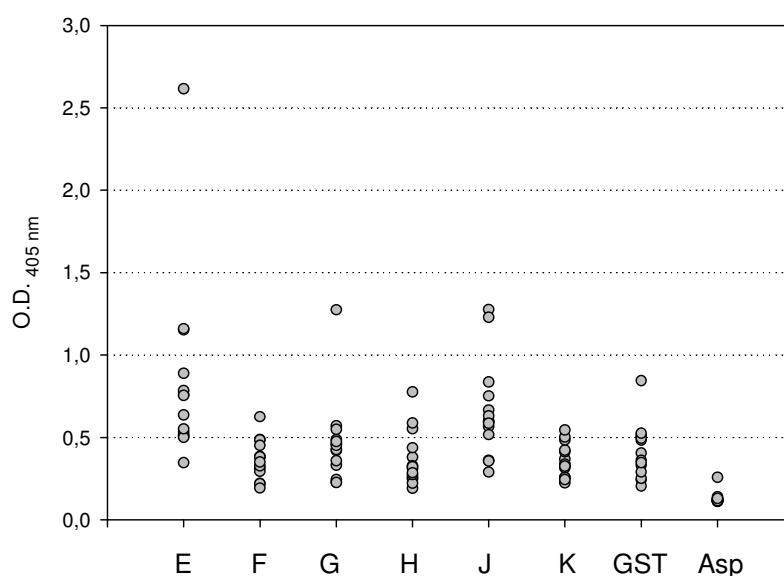


Abb. 39: Häufigkeitsverteilung der Titer gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das L-Asparaginase-Gesamtprotein (Asp) der Kontrollproben (n=14)

Man erkennt deutlich eine breitere Streuung der Messwerte für die GST-Fusionsproteine E-K gegenüber dem L-Asparaginase-Gesamtprotein.

	"stille Inaktivierung" Induktion	"stille Inaktivierung" Reinduktion	Differenz Induktion- Reinduktion
E vs. Asp	p = 0,0005	p = 0,1240	p = 0,0131
F vs. Asp	p = 0,0787	p = 0,0015	p = 0,0008
G vs. Asp	p = 0,0627	p = 0,0005	p = 0,0004
H vs. Asp	p = 0,0299	p = 0,0006	p = 0,0004
J vs. Asp	p = 0,0004	p = 0,0098	p = 0,0011
K vs. Asp	p = 0,0627	p = 0,0008	p = 0,0005

Tabelle 7: Ergebnisse der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für den Vergleich der GST-Fusionsproteine (E bis K) mit dem L-Asparaginase-Gesamtprotein (Asp) in der Gruppe der „stillen Inaktivierung“

Induktion				Reinduktion			
	Md	M	SD		Md	M	SD
Asp	0,104	0,198	0,396	Asp	0,106	0,113	0,023

Tabelle 8: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität (n=23) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen das Gesamtprotein (Asp)

Induktion				Reinduktion			
	Md	M	SD		Md	M	SD
Asp	0,130	0,239	0,246	Asp	2,545	2,571	1,394

Tabelle 9: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (n=19) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen das Gesamtprotein (Asp)

	Md	M	SD
Asp	0,119	0,130	0,038

Tabelle 10: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Kontrollgruppe (n=14) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen das Gesamtprotein (Asp)

4.9 ELISA

4.9.1 Bestimmung der Coating-Antigenkonzentration

4.9.1.1 L-Asparaginase-Gesamtprotein

Zunächst wurde durch Titration des L-Asparaginase-Gesamtproteins die optimale Proteinkonzentration für das Coating der Mikrotiterplatten ermittelt. Dafür wurde *E. coli* L-Asparaginase (Asparaginase medac) in einem Konzentrationsbereich von 0,3125 bis 40 µg/ml als Coating-Antigen auf Mikrotiterplatten eingesetzt. Die Positiv- und Negativkontrollen wurden in einer Serumverdünnung von 1:3.200, der Anti-Human IgG in einer Verdünnung von 1:20.000 verwendet. In Abbildung 40 sind die gemessenen Werte veranschaulicht. Dargestellt sind in den folgenden Abbildungen jeweils der Mittelwert mit einfacher Standardabweichung (Fehlerbalken).

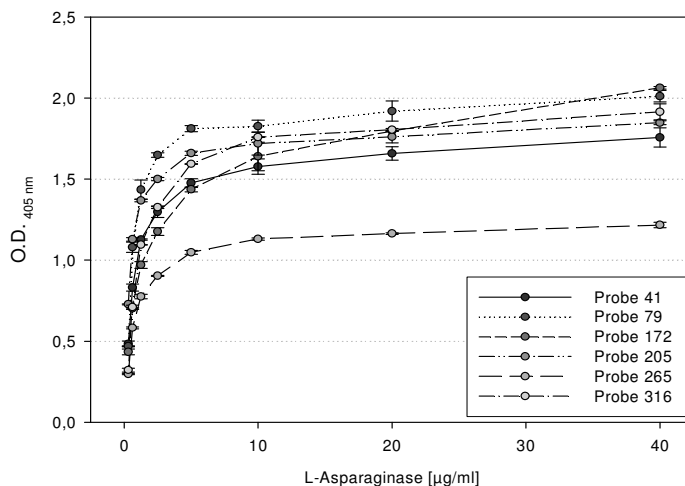


Abb. 40: Bestimmung der *E. coli* L-Asparaginase-Konzentration unter Verwendung von Patientenseren mit unterschiedlichen Antikörpertitern

Ein Sättigungsplateau war im Titrationsbereich zwischen 10 bis 40 µg/ml zu erreichen. Um eine optimale Sättigung der Mikrotiterplatten durch das Antigen zu gewährleisten, wurde für alle folgenden Messungen der Patientenproben eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml zum Coating der Mikrotiterplatten ausgewählt.

4.9.1.2 Negativkontrolle

Mit den Seren der Kontrollproben konnte, wie Abbildung 41 zeigt, nur eine geringe, den Leerwert der Mikrotiterplatte (ohne Antigen-Coating) kaum überschreitende Antikörper-Bindung festgestellt werden.

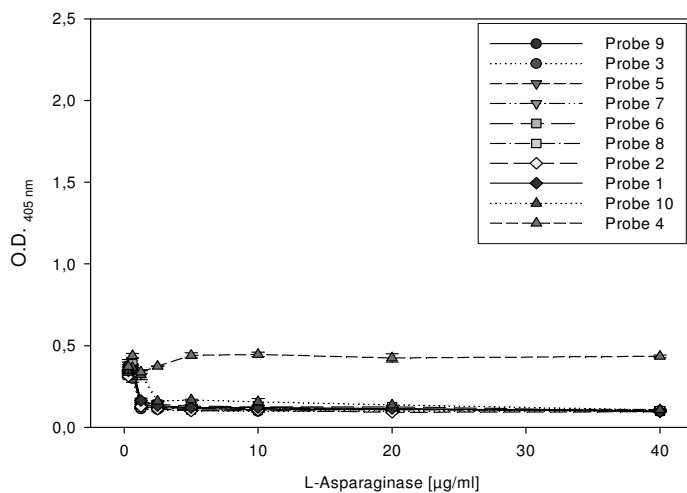


Abb. 41: Antikörper-Bindung der Kontrollproben

4.9.1.3 GST-Fusionsproteine

Die Ermittlung der optimalen Coating-Konzentration für die GST-Fusionsproteine wurde analog zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration durchgeführt. Die jeweiligen Fusionsproteine wurden als Antigene in Konzentrationsschritten von 3,25 bis 25 µg/ml aufgetragen; die Serumverdünnung betrug 1:50; die Sekundärantikörperverdünnung 1:10.000. Anhand des Sättigungsplateaus wurde für alle folgenden Messungen ein Wert von 10 µg/ml als Coating-Konzentration festgelegt.

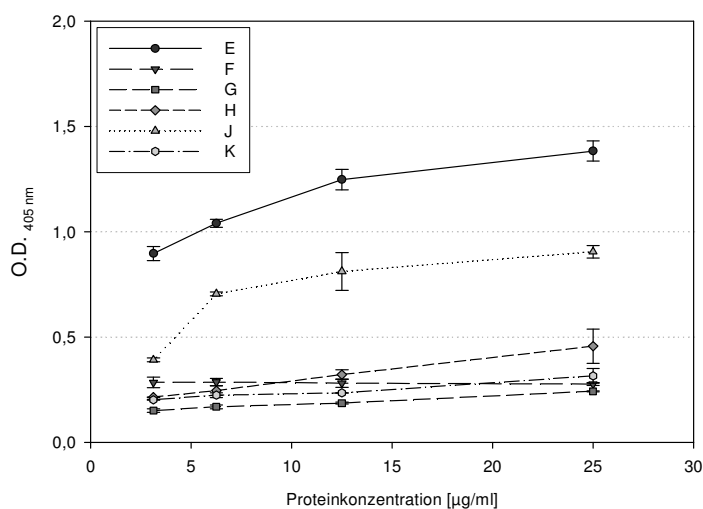


Abb. 42: Bestimmung der Coating-Konzentration der GST-Fusionsproteine unter Verwendung eines Patientenserums

4.9.2 Reaktivität des Peroxidase-konjugierten Anti-Human IgG

Das L-Asparaginase-Gesamtprotein wurde als Antigen in einer Konzentration von 10 µg/ml mit dem Serum eines Patienten mit „stiller Inaktivierung“ in einer Verdünnung von 1:3.200 inkubiert. Der Peroxidase-konjugierte Anti-Human IgG (Sekundärantikörper) wurde in mehreren Verdünnungsschritten von 1:10.000 bis 1:40.000 aufgetragen. Abbildung 43 beschreibt annähernd eine Gerade durch die Verdünnungsreihe. Für alle weiteren Messungen mit dem Gesamtprotein wurde eine Verdünnung der Sekundärantikörperlösung von 1:20.000 verwendet.

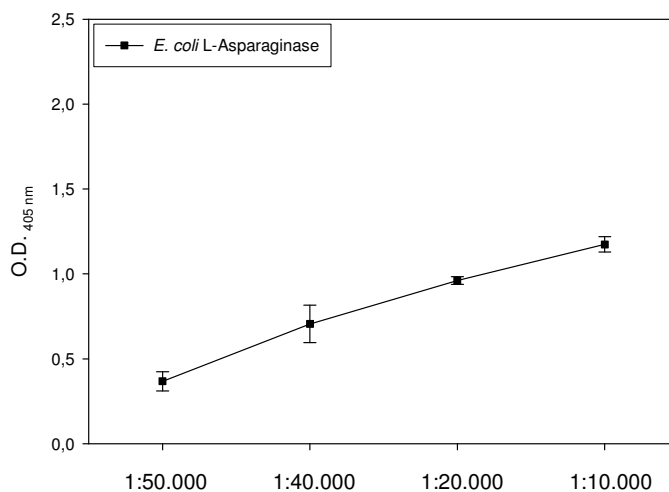


Abb. 43: Reaktivität des Anti-Human IgG (Sekundärantikörper) in einer Verdünnung zwischen 1:10.000 und 1:50.000, Antigen: L-Asparaginase-Gesamtprotein

Abbildung 44 beschreibt die Reaktivität der Sekundärantikörperlösung bei Einsatz der GST-Fusionsproteine als Antigene annähernd linear entlang der Verdünnungsstufen. Die Coating Konzentration beträgt 10 µg/ml; die Serumprobe ist in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen. Für die späteren Messungen im ELISA wurde eine Verdünnung der Sekundärantikörperlösung von 1:10.000 verwendet.

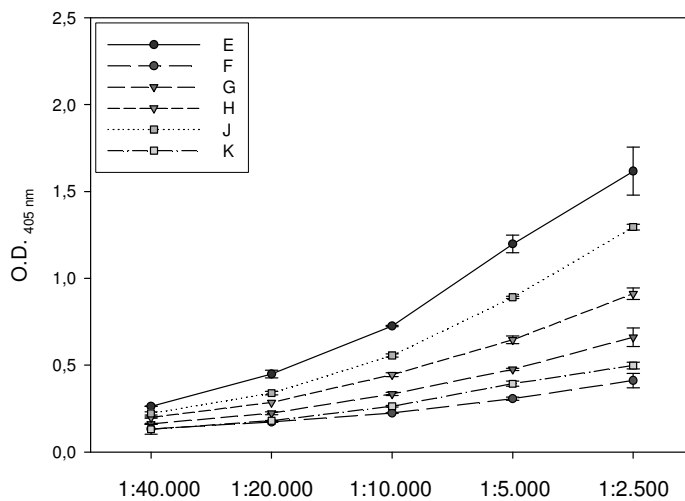


Abb. 44: Reaktivität des Anti-Human IgG (Sekundärantikörper) in einer Verdünnung zwischen 1:2.500 und 1:40.000, Antigen: GST-Fusionsproteine (E-K)

4.9.3 Linearität der Serumproben

Die Linearität der Serumproben wurde in separaten Ansätzen jeweils für das L-Asparaginase-Gesamtprotein und die GST-Fusionsproteine getestet.

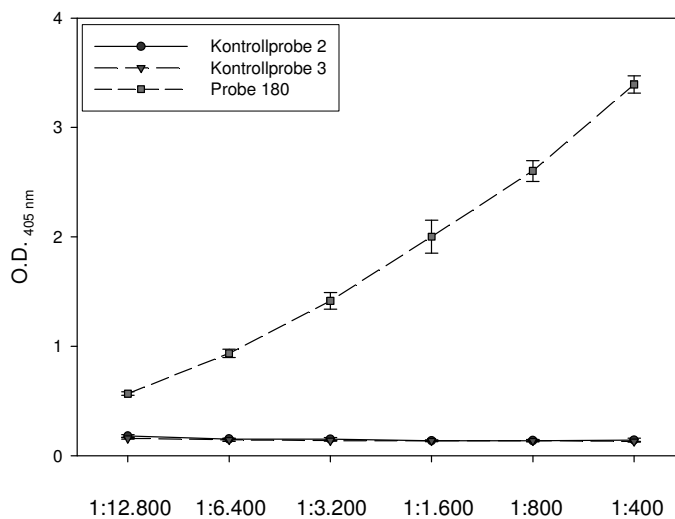


Abb. 45: Untersuchungen zur Linearität der Antikörper-Bindung einer Serumprobe eines Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (Probe 180) und zweier Kontrollproben (Probe 2 und 3) in einer Verdünnung zwischen 1:400 und 1:12.800; Antigen: L-Asparaginase-Gesamtprotein

Abbildung 45 zeigt eine annähernde Linearität der Absorption ($O.D._{405nm}$) im Bereich von 0,5 bis 3,5 bei den Verdünnungsschritten des Serums von 1:400 bis 1:12.800. In derselben Abbildung sind die Verdünnungsstufen von zwei Kontrollproben aufgetragen.

Orientierend an diesem Ergebnis wurde für die Messungen im ELISA eine Serumverdünnung von 1:3.200 verwendet.

Analog dazu zeigen Abbildungen 46 und 47 die Linearitätsnachweise der Serumproben unter Einsatz der GST-Fusionsproteine. Die Serumverdünnungsstufen variieren von 1:50 bis 1:1.600. Für die Bestimmung der L-Asparaginase-Antikörper wurde eine Serumverdünnung von 1:200 eingesetzt.

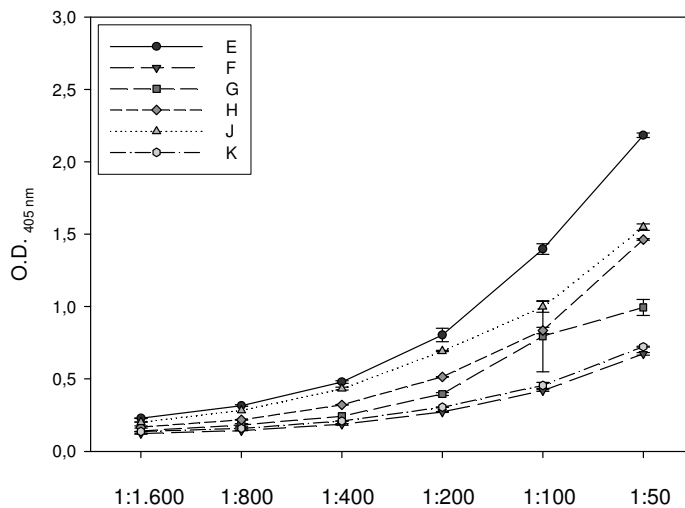


Abb. 46: Untersuchungen zur Linearität der Antikörper-Bindung einer Serumprobe eines Patienten mit „stiller Inaktivierung“ in einer Verdünnung zwischen 1:50 und 1:1.600; Antigen: GST-Fusionsproteine (E-K)

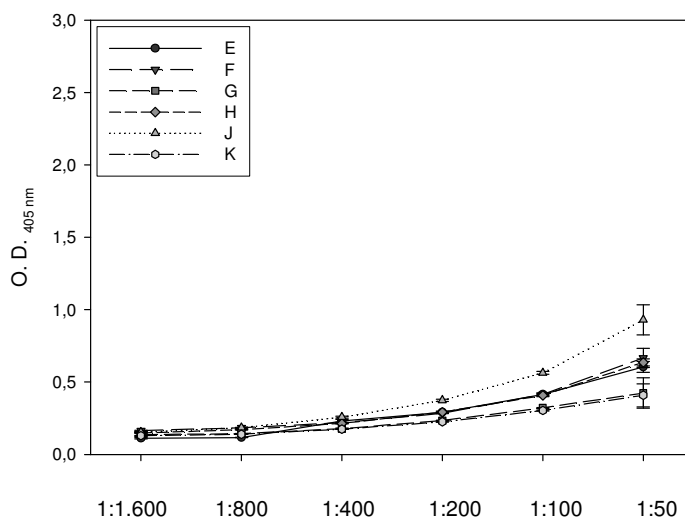


Abb. 47: Untersuchungen zur Linearität der Antikörper-Bindung von Kontrollprobe 9 in einer Verdünnung zwischen 1:50 und 1:1.600; Antigen: GST-Fusionsproteine (E-K)

4.9.4 Intra- und Inter-Assay-Variabilität

Die Intra-Assay-Variabilität wird durch eine Auswahl von Messergebnissen einer Dreifach-Bestimmung von zwei Proben in Tabelle 11 demonstriert.

Probe 258			M	SD	COV	Probe 27			M	SD	COV
0.351	0,335	0,356	0,346	0,015	4,3%	0.217	0,213	0,216	0,215	0,002	1,0%
0.327	0,320	0,332	0,326	0,008	2,6%	0.213	0,211	0,203	0,207	0,006	2,7%
0.294	0,269	0,277	0,273	0,006	2,1%	0.218	0,195	0,190	0,193	0,004	1,8%
0.252	0,265	0,252	0,259	0,009	3,6%	0.180	0,169	0,162	0,166	0,005	3,0%
0.177	0,173	0,174	0,174	0,001	0,4%	0.123	0,120	0,126	0,123	0,004	3,4%
0.107	0,111	0,110	0,111	0,001	0,6%	0.123	0,120	0,130	0,125	0,007	5,7%
0.094	0,089	0,091	0,090	0,001	1,6%	0.108	0,109	0,099	0,104	0,007	6,8%
0.085	0,089	0,084	0,087	0,004	4,1%	0.100	0,097	0,093	0,095	0,003	3,0%

Tabelle 11: Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität durch 3-fach Bestimmung zweier Serumproben mit Mittelwert (M), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (COV)

Die Inter-Assay-Variabilität wurde anhand einer für diesen Zweck bereitgestellten und aliquotierten Serumprobe untersucht. Dieselbe Probe wurde bei sämtlichen Messungen auf allen Mikrotiterplatten in einer Zweifach-Bestimmung mitgeführt. Die Ergebnisse der Daten sind mit Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient für das jeweilige Fragment in Tabelle 12 dargestellt.

Probe 392	M	SD	COV [%]
E	0,657	0,122	18,6
F	0,260	0,059	22,6
G	0,302	0,064	21,3
H	0,453	0,088	19,5
J	0,641	0,148	23,0
K	0,274	0,068	24,6
GST	0,272	0,077	28,3
Asp	0,125	0,014	11,1

Tabelle 12: Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität durch Mitführen einer Probe auf allen Mikrotiterplatten (n=49). Dargestellt sind Mittelwert (M), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (COV) in % der GST-Fusionsproteine E-K, GST und des Gesamtproteins (Asp)

Nach den Berechnungen ergeben sich Variationskoeffizienten in Höhe von 18,6% für Fragment E, 22,6% für Fragment F, 21,3% für Fragment G, 19,5% für Fragment H, 23,0% für Fragment J, 24,6% für Fragment K und 11,1% für das L-Asparaginase-Gesamtprotein. Der höchste Variationskoeffizient in Höhe von 28,3 % zeigt sich für GST.

DISKUSSION

5.1 Grundlegendes

Aufgrund der bakteriellen Herkunft sind immunologische Reaktionen häufige Nebenwirkungen auf eine L-Asparaginase-Gabe [7,13,29]. Neben einer klinischen Hypersensitivitätsreaktion gefährdet in erster Linie der Mechanismus der „stillen Inaktivierung“ den Therapieerfolg entscheidend [22,50,65,93].

Obwohl es zahlreiche Tests zur Bestimmung von Antikörpern gegen L-Asparaginase gibt, ist der routinemäßige Einsatz eines Assays in der Klinik bis heute nicht etabliert. Die allgemein geringe Sensitivität und Spezifität der Messmethoden erlauben keinen rationalen Einsatz in der Praxis. Da der Nachweis von L-Asparaginase-Antikörpern nicht zwangsläufig mit einer klinisch relevanten immunologischen Reaktion einhergeht, lassen sich zuverlässige Aussagen allenfalls über zu erwartende Tendenzen treffen. Eine direkte Abschätzung des Risikos einer klinischen Hypersensitivitätsreaktion oder einer „stillen Inaktivierung“ des Enzyms ist für den einzelnen Patienten nicht möglich. Zur individuellen Therapiesteuerung eignet sich bisher kein Assay.

Da jedoch eine suffiziente Enzymaktivität die Voraussetzung für eine optimale Therapieintensität darstellt, ist der Einsatz eines Drug-Monitoring Programms unerlässlich. Gegenwärtig wird die Therapiekontrolle durch Bestimmung der Serumaktivität von L-Asparaginase gewährleistet. Diese Methode ist nur mit großem technischen Aufwand und der häufigen Abnahme von Blutproben noch bis zu 1-2 Wochen nach der letzten Gabe durchführbar. Zudem ist die Bestimmung der enzymatischen Aktivität lediglich als Surrogat für die L-Asparagin-Konzentration im Serum zu verstehen, deren Suppression der tumorinhibierenden Eigenschaft des Enzyms zugesprochen wird. Eine Messung der Aminosäurekonzentration ist in der klinischen Routine mit ausreichender Genauigkeit nahezu unmöglich, da auch nach Abnahme der Blutprobe ein weiterer Umsatz der Aminosäure durch eine mögliche L-Asparaginase-Aktivität stattfindet. Dies führt regelhaft zu falsch gemessenen Werten.

Der Einsatz eines Antikörper-Assays, der mit hoher Sensitivität und Spezifität den Antikörper-Status des Patienten erfasst, hätte direkten Einfluss auf die Therapieplanung und -durchführung. Eine immunologische Reaktion, insbesondere das Phänomen der „stillen Inaktivierung“ könnte frühzeitig erkannt und durch einen Präparatewechsel möglicherweise vermieden werden.

Regelmäßig können jedoch auch bei Personen ohne vorherige L-Asparaginase-Exposition mit den gegenwärtigen Testverfahren Antikörpertiter nachgewiesen werden [46,64]. In der überwiegenden Anzahl der Fälle scheinen diese Antikörper keine Relevanz im Sinne einer immunologischen Reaktion zu haben. Sie beeinflussen jedoch deutlich die Aussagekraft der Assays.

Überlegungen, die prognostische Aussagefähigkeit der gegenwärtigen Testverfahren zu verbessern, führten in der Marburger Arbeitsgruppe zu der Idee, einen epitop-spezifischen Assay zu entwickeln. Dadurch sollte eine Reduktion von möglichen Kreuzreaktionen zwischen eigentlich gegen andere Proteine gerichteten Antikörpern im Serum und dem L-Asparaginase-Protein erreicht werden. Dazu wurden nicht – wie üblich – das L-Asparaginase-Gesamtprotein, sondern Fragmente als Antigene verwendet.

Um die Frage der grundsätzlichen Durchführbarkeit zu klären, wurden in ersten Versuchen willkürlich hergestellte Proteinfragmente der L-Asparaginase als Antigene in einem ELISA eingesetzt. Die Fragmente wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert, um eine Entfaltung der Proteine analog zur Tertiärstruktur des L-Asparaginase-Proteins zu ermöglichen. Mit einer Bindung von Antikörpern an die Fusionsproteine konnte die Praktikabilität der Methode bestätigt werden. Zudem zeigte sich auch ein Zusammenhang zwischen der Bildung von Antikörpern gegen das C-terminale Fragment (AS 237-326) und der Inaktivierungsgeschwindigkeit des Enzyms [69]. Da zum Zeitpunkt dieser Arbeiten noch kein „Epitop-Mapping“ der *E. coli* L-Asparaginase stattgefunden hatte und lediglich Daten für die L-Asparaginase isoliert aus *Erwinia chrysanthemi* vorlagen [55], wurde für die nächste Generation von Fragmenten zur theoretischen Epitop-Suche ein Computer-Strukturmodell verwendet. In den folgenden Messungen konnte jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen Antikörpertitern und einer schnellen Inaktivierung gefunden werden [14]. Da die theoretische Vorhersage von Epitopen sich als nicht sehr zuverlässig erwies, wurde ein experimentelles Epitop-Mapping der *E. coli* L-Asparaginase durchgeführt. Die Identifizierung von B-Zell-Epitopen erfolgte mittels „Phage-Display“ und der „SPOTs“-Methode [87].

Durch das „Phage-Display“ wurde ein „Epitop-Mapping“ auf DNA-Ebene ermöglicht. Zum Einsatz kam eine kommerzielle Peptid-Bibliothek mit willkürlich hergestellten Peptiden, die aus jeweils sieben Aminosäuren bestehend mit dem Hüllprotein pIII von M13 Phagen an deren Oberfläche fusioniert waren. Dadurch wurden alle aus sieben proteinogenen Aminosäuren bestehenden möglichen Peptidkombinationen abgebildet.

Durch die Bindung von Anti-L-Asparaginase IgG eines Kaninchenserums wurden in mehreren Schritten diejenigen Phagen selektiert, die antigene Peptidsequenzen präsentierten.

Mit der „SPOTs“-Methode konnten Epitope auf Proteinebene identifiziert werden. Dabei wurden auf einer Membran gebundene definierte Peptidsequenzen mit käuflichen Antikörpern oder Patientenseren auf Bindung untersucht. Zum Screening wurden käufliche L-Asparaginase-Antikörper vom Kaninchen eingesetzt. 159 verschiedene aus zehn Aminosäuren bestehende Peptide, die um jeweils zwei Aminosäuren versetzt die gesamte Aminosäuresequenz einer L-Asparaginase-Untereinheit umfassten, wurden auf Antikörper-Bindung untersucht. Mit beiden unabhängig voneinander eingesetzten Methoden konnte eine hohe Übereinstimmung von Aminosäuresequenzen mit starker Bindungsreaktion erzielt werden.

Auf den Erkenntnissen des experimentellen „Epitop-Mappings“ durch das „Phage Display“ basierend wurden die DNA-Sequenzen von sechs antigenen Strukturen in Plasmide kloniert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sie als GST-Fusionsproteine exprimiert und als Antigene in einem ELISA eingesetzt. Anschließend wurden Seren von pädiatrischen Patienten aus der NOPHO-ALL 2000 Studie auf ihre Antikörper-Bindung untersucht.

5.2 Material und Methoden

Aufgrund der einfachen und kostengünstigen Durchführung wurde ein enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) zum Nachweis der Antikörper verwendet.

Mit einem Intra-Assay-Variationskoeffizienten in Höhe von 0,4 - 6,8 % (siehe Tabelle 11) je nach GST-Fusionsprotein zeigte der aufgebaute Assay eine hohe Genauigkeit. Die Schwierigkeiten der ELISA-Methode lagen insbesondere in der Reproduzierbarkeit der Messungen über den gesamten Untersuchungszeitraum. Mit Inter-Assay-Variationskoeffizienten in einem Bereich von 11,1 - 24,6 % (siehe Tabelle 12) für die Fusionsproteine und das GST-Protein von 28,3% lag der Assay noch innerhalb eines akzeptablen Limits und es kann von einer angemessenen Wiederholbarkeit des Tests ausgegangen werden.

Der wichtigste, die Inter-Assay-Variabilität beeinflussende Faktor, war die Inkubationszeit der ABTS-Farbstofflösung. Als letzter Arbeitsschritt im ELISA erzeugte schon eine geringe Abweichung von der exakten Inkubationszeit einen deutlichen Unterschied in den Messwerten der Absorption (O.D. _{405 nm}). Ebenfalls entscheidend war der „Pipettierfehler“ beim Herstellen der Verdünnungslösung des Anti-Human IgG (Sekundärantikörper). Aufgrund der geringen Pipettier Volumina von 1-2 µl führten bereits geringe Abweichungen bzw. Anlagerungen an den Pipettenspitzen zu Fehlern. Daher wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg eine für diesen Zweck aliquotierte Serumprobe auf jeder Mikrotiterplatte in zweifacher Bestimmung mitgeführt.

Die Verwendung von GST als Fusionspartner für die L-Asparaginase-Proteinfragmente basierte auf den Erfahrungen vorangegangener Untersuchungen der Arbeitsgruppe, dass einzelne Proteinfragmente eine zu geringe Antigenität besitzen, um sie in einem ELISA einzusetzen [99]. Grundlage bildete dabei die Theorie, dass durch die Bindung an GST eine dem L-Asparaginase-Gesamtprotein vergleichbare Tertiärstruktur erreicht und eine Ausbildung von Epitopen, welcher der in vivo Situation nahe kommen, begünstigt wird.

Während der Einsatz eines käuflichen Kaninchen-Antiserums gegen *E. coli* L-Asparaginase einen kaum den Leerwert der Mikrotiterplatte übersteigenden Antikörpertiter gegen das GST-Protein erbrachte, konnte im Serum von Patienten häufig eine bedeutende Bindung an GST festgestellt werden. Zur Kontrolle war bei jeder Patientenprobe auch der Antikörpertiter gegen GST ohne inseriertes L-Asparaginase-Fragment bestimmt worden.

Eine Erklärung für die Bindung von Antikörpern der humanen Seren an den GST-Anteil lässt sich nicht finden. Die Messungen haben jedoch gezeigt, dass die Titer gegen GST individuell stark differierten. Einige Patienten wiesen eine erhebliche Bindung von Antikörpern an das GST-Protein auf, während bei anderen die Antikörpertiter nur gering ausgeprägt waren und den Leerwert der Mikrotiterplatte kaum überschritten. Trotz der teilweise erheblichen interindividuellen Unterschiede in der Höhe des Antikörpertiters war ein intraindividueller Unterschied, bis auf wenige Ausnahmen, nur gering ausgeprägt. Das bedeutete, dass der Antikörpertiter gegen GST beim einzelnen Patienten im zeitlichen Ablauf der Therapie in der Regel konstant blieb. Während der Behandlungsdauer, insbesondere nach dem applikationsfreien Intervall von der Induktions- zur Reinduktionsphase war nur bei wenigen Patienten ein relevanter Anstieg oder Abfall des Antikörpertiters gegen GST zu beobachten.

Eine Subtraktion des GST-Antikörpertiters von denen der GST-Fusionsproteine wurde nicht durchgeführt, da die gemessenen Absorptionen keine verhältnisskalierten Parameter darstellen. Ein einfacher mathematischer Rechenschritt würde der Komplexität der Bindungsreaktion nicht gerecht werden, zumal es sich um biologische Prozesse der „Antigen-Antikörper-Reaktion“ handelt.

Dennoch sollte die Höhe der GST-Titer bei der Interpretation der übrigen Titer gegen die Fusionsproteine beachtet werden.

Möglicherweise liegen in der Verwendung von L-Asparaginase-Proteinfragmenten ohne Fusionspartner weitere Entwicklungsmöglichkeiten zur Verbesserung der Problematik der teilweise erheblichen antigenen Eigenschaften des GST-Proteins.

Um festzustellen, ob sich die von uns ausgewählten Fragmente auch ohne das Fusionsprotein als Antigene im ELISA eigneten, wurde GST durch den Einsatz einer „site-specific“-Protease abgetrennt. Dabei wurde postuliert, dass eine zunächst durch Fusion an das GST-Protein erreichte Faltung der Fragmente auch nach Abtrennung des GST-Anteils erhalten bleibt.

Für einen einfachen und direkten Vergleich wurden 19 Serumproben von neun Patienten ausgewählt, deren Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine bereits bekannt waren. Alle wiesen ein charakteristisches Antikörpermuster auf. Die Messungen wurden zeitlich unabhängig voneinander und mit Proteinpräparationen aus unterschiedlichen Expressionen durchgeführt.

Die Antikörpertiter zeigten in beiden Messungen eine große Übereinstimmung. An alle Proteinfragmente konnte eine Bindung von Antikörpern nachgewiesen werden, so dass von einer suffizienten Antigenität der Fragmente ausgegangen werden kann. Es ist

anzunehmen, dass die Fragmente auch nach Abtrennung des GST-Proteins in ihrer Tertiärstruktur erhalten blieben und eine Ausbildung von Epitopen weiterhin möglich war. Eine grundsätzliche Eignung von L-Asparaginase-Proteinfragmenten nach Abtrennung von einem Fusionspartner zur Verwendung als Antigen in einem ELISA wurde damit gezeigt.

Das GST-Protein stellte mit 29.000 Dalton den Hauptanteil am Fusionsprotein dar. Entsprechend der unterschiedlichen Größe entfielen für das Fusionsprotein E ca. 33% des Gesamtproteins auf das L-Asparaginase-Fragment. Respektive für F 13%, G 14%, H 17%, J 30% und K 11%. Analog dazu lag die Proteinkonzentration für das Antigen-Coating der Mikrotiterplatten bei schätzungsweise 1,1 bis 1,7 µg/ml für die kurzen bzw. 3,0 bis 3,3 µg/ml für die langen GST-Fusionsproteine. Die unterschiedliche molare Konzentration hatte möglicherweise einen Einfluss auf die gemessenen Absorptionen. Auf die Einführung einer weiteren „Variablen“ wurde jedoch aufgrund des nicht sicher einzuschätzenden Gesamteinflusses verzichtet.

Zur Klärung der Fragestellung, ob die Bildung von Antikörpern gegen bestimmte Sequenzen der L-Asparaginase einer spezifischen Reaktionsform zugeordnet werden können, wäre es von Interesse gewesen, eine größere Anzahl von Serumproben derjenigen Patienten zu messen, die auf eine L-Asparaginase-Therapie mit einer klinischen Hypersensitivitätsreaktion reagierten. Da im Patientenkollektiv der NOPHO ALL-2000 Studie keine Proben zur Verfügung standen, wurde auf sechs Serumproben von drei Patienten mit klinischer Reaktion aus der GMALL-Studie (German Multicenter ALL Trials, einer multizentrischen Therapieoptimierungsstudie der akuten lymphatischen Leukämie bei Erwachsenen und Adoleszenten ab 15 Jahren) zurückgegriffen.

Die Messungen zeigten eine Bindung von Antikörpern an die einzelnen Fusionsproteine mit unterschiedlichem Verteilungsmuster. Im Serum dieser Patienten ließen sich neben Antikörpertitern gegen die Fusionsproteine E und J auch Titer gegen die Fusionsproteine H und K nachweisen. Vergleichsweise niedrig war der Titer gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein. Über ein mögliches charakteristisches Antikörpermuster, welches spezifisch für eine klinische Reaktion ist, kann aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten und zur Verfügung stehenden Proben jedoch keine Aussage getroffen werden.

Da es sich um eine retrospektive Untersuchung handelte, erfolgte der Zugriff auf bereits vorhandenes Patientenmaterial und -daten. Daher standen uns nicht immer von allen Patienten Serumproben der Protokolltage zur Verfügung, an denen das Studienprotokoll eine Abnahme vorsah. Die Anzahl der Proben aus der Induktions- und Reinduktionsphase innerhalb der Patientengruppen war somit nicht identisch.

Aufgrund der grundsätzlich positiven Ergebnisse erscheint eine prospektive Untersuchung sinnvoll. Zur Optimierung des Studiendesigns sollten von jedem Patienten eine Anzahl von Serumproben derselben Protokolltage aus Induktions- und Reinduktionsphase gewonnen werden. Aufgrund der bekannten Problematik, dass Antikörper gegen L-Asparaginase auch im Serum gesunder Menschen ohne vorherige L-Asparaginase-Exposition vorhanden sein können, sollte eine Probe jedes Patienten vor dem ersten Kontakt mit dem Medikament verfügbar sein. Damit ließe sich möglicherweise eine Bewertung und Einordnung dieser prätherapeutisch vorhandenen Antikörper durchführen.

Weiterhin erscheint es sinnvoll, eine Modifikation der bisher eingesetzten Fragmente vorzunehmen. Insbesondere die Verwendung der Aminosäuresequenzen der Fragmente E und J in verkürzter bzw. versetzter Form könnte zu einer weiteren Eingrenzung der bindungsrelevanten Epitope führen. Entwicklungsmöglichkeiten liegen ebenfalls in der Verwendung anderer Fusionspartner.

5.3 Klinische Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war eine Optimierung der Nachweismethode von Antikörpern gegen L-Asparaginase. Es galt herauszufinden, ob sich die im ELISA eingesetzten Fragmente des L-Asparaginase-Proteins zur Bestimmung spezifischer Antikörper eignen. Langfristiges Ziel sollte die Identifizierung von Epitopen mit klinischer Relevanz sein, gegen die Patienten mit einer „stillen Inaktivierung“ und/oder Hypersensitivitätsreaktion Antikörper bilden.

Für die Bestimmung von Antikörpertitern gegen die Fusionsproteine standen uns Seren von pädiatrischen Patienten aus der NOPHO-ALL 2000 Studie zur Verfügung. Innerhalb des Studienkollektivs konnten im Beobachtungszeitraum weniger die sich klinisch manifestierenden Reaktionen als das Phänomen der „stillen Inaktivierung“ gesehen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde besonders auf eine mögliche Korrelation zwischen einem Antikörpertiter gegen ein bestimmtes Fusionsprotein und dem rapiden Abfall der Enzymaktivität geachtet.

Neben den Serumproben konnten wir nach Beendigung unserer Untersuchungen auch auf Daten aus dem Drug-Monitoring Programm der NOPHO zurückgreifen. Diese Daten umfassten die Messung der Antikörpertiter unter Einsatz des Gesamtproteins als Antigen sowie die Messung der L-Asparaginase-Aktivität jeweils vor Gabe des Medikaments, d.h. Talaktivitäten. Für jede Probe war es dadurch möglich, den von uns gemessenen Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine in direkter Beziehung zur Enzymaktivität zu setzen. Dies war notwendig, um eine korrekte Eingruppierung der Patienten zu gewährleisten.

Die Frage nach der unteren Grenze einer therapeutisch wirksamen Aktivität der L-Asparaginase ist in der Literatur wiederholt diskutiert wurden. Ferner schließt sich daran die Schwierigkeit an, Patienten mit einer „stillen Inaktivierung“ eindeutig zu klassifizieren. Orientierend an den Untersuchungen von Riccardi et al. aus dem Jahr 1981 wird bis heute ein L-Asparaginase-Aktivitätswert von ≥ 100 U/l im Serum als sichere untere Grenze angesehen [70]. Um eine optimale L-Asparagin-Depletion sowohl im Serum als auch im Liquor cerebrospinalis zu erzielen, wird eine Aktivität ≥ 100 U/l über mindestens 14 Tage angestrebt. Messungen verschiedener Untersucher haben gezeigt, dass auch in Proben mit Serumaktivitäten bis zu 50 U/l noch eine ausreichende Depletion von L-Asparagin zu erreichen ist [4,9,15,71]. Immer muss bei den Studien mit Messung der L-Asparagin-Konzentration jedoch beachtet werden,

dass auch nach Entnahme der Blutprobe durch eine eventuell weiterhin vorhandene L-Asparaginase-Aktivität noch Substrat umgesetzt wird und falsch niedrige Konzentrationen bestimmt werden. Aus diesem Grund wird die L-Asparagin-Konzentration im Serum als eigentlicher Marker der Therapieeffektivität in der klinischen Routine nicht bestimmt. Als Surrogat dient die Messung der L-Asparaginase-Aktivität. Da bis heute ein „minimaler“ Grenzwert für eine therapeutische Effektivität nicht eindeutig festgelegt ist, wird zur Gewährleistung der Therapiesicherheit für die Mehrzahl der Patienten gegenwärtig ein Wert von ≥ 100 U/l empfohlen [56,81].

In der vorliegenden Untersuchung zeigten 19 von 61 Patienten einen Abfall der Enzymaktivität auf Werte ≤ 100 U/l innerhalb von zwei Wochen nach L-Asparaginase-Erstgabe. Diese Patienten wurden der Gruppe der „stillen Inaktivierung“ zugeordnet. 23 Patienten wiesen eine normale therapeutische Enzymaktivität auf; die restlichen gemessenen Proben von 19 Patienten wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Meist war die Probenanzahl zu gering bzw. lediglich aus einer Therapiephase, so dass eine Zuordnung in eine Patientengruppe nicht sicher möglich war. Die Mehrzahl der Patienten mit einer raschen Enzyminaktivierung zeigte einen Abfall der Aktivität unterhalb des Bestimmungsbereichs der parallel mit hohen Antikörpertitern auftrat. Um eine eindeutige Zuordnung in die Gruppe der „stillen Inaktivierung“ problemlos zu garantieren, sollten die Daten der L-Asparaginase-Aktivitäten immer zusammen mit den Antikörpermessungen betrachtet werden.

5.3.1 „Stille Inaktivierung“ und Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine

Die Messungen der Patientenserum im untersuchten Gesamtkollektiv haben ergeben, dass in vielen Fällen von „stiller Inaktivierung“ am Ende der Reinduktionsphase hohe Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E und J nachweisbar waren. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg des medianen Antikörpertiters für Fusionsprotein E ($p = 0,0023$) und J ($p = 0,0494$) vom Ende der Induktion zum Ende der Reinduktion in der Gruppe der „stillen Inaktivierung“.

Patienten mit einer „stillen Inaktivierung“ bildeten signifikant mehr Antikörper gegen das Fusionsprotein E ($p < 0,001$) und J ($p = 0,0016$) als Patienten mit einer therapeutischen Enzymaktivität am Ende der Reinduktion; ein signifikanter Unterschied in den Antikörperwerten konnte jedoch auch für die übrigen Fragmente nachgewiesen werden.

Die Kontrollgruppe bildete signifikant weniger Antikörper gegen das Fusionsprotein E sowie das Gesamtprotein als Patienten mit einer „stillen Inaktivierung“ am Ende der Reinduktion.

Die niedrigen Titer in der Induktion und die Zunahme der Antikörperproduktion in der Reinduktion entsprechen den Beobachtungen weiterer Untersucher [45,46]. In der Regel erfolgt durch eine Sensibilisierung mit L-Asparaginase in der Induktion nach einem ca. zehn Wochen andauernden applikationsfreien Intervall durch erneuten Kontakt in der Reinduktion eine Zunahme der Antikörperproduktion [88].

Vom Ende der Induktion zum Ende der Reinduktion stiegen die Antikörpertiter der „stillen Inaktivierer“ gegen das Fusionsprotein E und das L-Asparaginase-Gesamtprotein signifikant mehr als die der Patienten mit therapeutischer Aktivität.

Für die übrigen Fusionsproteine F, G, H und K wurden im Mittel deutlich niedrigere Antikörpertiter gemessen. Ein klarer Zusammenhang zwischen einer Antikörperformation und einer Enzyminaktivierung konnte für diese Fusionsproteine nicht erkannt werden.

In der Gruppe der Kontrollproben konnten bei zwei Proben teilweise erhebliche Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E, G und J gemessen werden. Mit diesen Messungen bestätigte sich die Erfahrung weiterer Untersucher, welche in Serumproben nativ gegenüber einer L-Asparaginase-Gabe unspezifische Bindungsreaktionen nachweisen konnten [6,64]. Möglicherweise enthalten auch die im ELISA verwendeten Proteinfragmente Epitope, an welche Antikörper im Serum der Patienten gebunden haben, die keine Relevanz im Sinne einer immunologischen Reaktion gegen das L-Asparaginase-Protein haben.

Weiterhin muss beachtet werden, dass der Median des Antikörpertiters gegen GST bei den Kontrollproben über den Werten in der Gruppe der „stillen Inaktivierung“ und therapeutischen Enzymaktivität lag.

Aufgrund des erheblichen Streubereichs der Kontrollprobentiter gegen die Fusionsproteine wurde auf die Festlegung eines unteren „Cut-off-Wertes“ verzichtet.

Die Fusionsproteine E und J waren mit 408 bp und 339 bp die längsten der sechs L-Asparaginase-Fragmente. Sie repräsentierten durch die Aminosäuresequenzen (AS) 1-136 und 214-326 den N- bzw. C-terminalen Anteil des L-Asparaginase-Moleküls. Das Fusionsprotein F (123 bp) umfasste mit der Sequenz 25-65 wiederum einen Teilab-

schnitt von E, Fusionsprotein K (108 bp) mit der Sequenz 237-272 einen Teilabschnitt von J. Die restlichen Fragmente waren überlappend hergestellt, so dass mit sechs Fragmenten eine gesamte Untereinheit des Enzyms abgedeckt wurde.

Durch die Arbeiten des Epitop-Mappings wurden mit großer Übereinstimmung der beiden verwendeten Methoden (SPOTs-Methode und Phage-Display) bestimmte Strukturen der *E. coli* L-Asparaginase gefunden, an denen eine häufige Bindungsreaktion nachzuweisen war. Drei dieser identifizierten Bereiche entsprachen den Aminosäuresequenzen 53-59 (VVNIGSQ), 252-258 (SVFDTLA) und 283-289 (EVDDAKY). Im „Phage-Display“ wiesen zwei Drittel aller Peptide eine Bindungsreaktion nahe oder direkt an den AS 252-258 auf, so dass dieser Bereich möglicherweise als dominantes Epitop eingeordnet werden kann. Weitere antigene Strukturen konnten den Aminosäuresequenzen 201-207 (TPFDVSK) und 129-135 (LYAAINL) zugeordnet werden [87].

Die langen Proteinfragmente E und J präsentierten die Epitope mit den Aminosäuresequenzen 53-59, 252-258 und 283-289. Die Sequenzen der AS 201-207 und 129-135 entsprachen jeweils den Proteinfragmenten H und G. Die kurzen Fragmente F und K waren Teilabschnitte der langen Fragmente E und J und enthielten wiederholt die möglicherweise dominanten Epitope mit den Sequenzen 53-59 und 252-258.

Eine Bindung von Antikörpern konnte in der Gruppe der „stillen Inaktivierung“ häufig für die Fusionsproteine E und J festgestellt werden. Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine F und K, welche wiederum Teilabschnitte der vorstehenden Fusionsproteine darstellten, konnten nur in wenigen Ausnahmen beobachtet werden. Obwohl F und K die Sequenzen möglicherweise dominanter Epitope umfassten, zeigte sich keine suffiziente Bindung von Antikörpern. Auch der Einsatz des käuflichen Anti-*E.coli* L-Asparaginase-Antiserums ergab gegen die GST-Fusionsproteine F und K keinen relevanten Antikörpertiter. Es kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner vollständigen Ausbildung der Tertiärstruktur der Proteinfragmente gekommen ist. Ob sich möglicherweise ein deutlicheres Bindungsverhalten durch die Auswahl längerer bzw. versetzter Aminosäuresequenzen oder durch Verwendung anderer Fusionspartner gezeigt hätte, bleibt unklar.

Weiterhin bleibt der genaue Einfluss der Fragmentgröße auf die Immunogenität der Proteine unklar. Aufgrund der Masse des GST-Anteils wurden die durch die unterschiedlichen L-Asparaginase-Fragmente verursachten prozentualen Unterschiede am Gesamtprotein vernachlässigt. Für einen direkten Vergleich der Antikörperbindung

an das GST-Protein wurde dieses ohne inserierte L-Asparaginase-Sequenz auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt.

Um die Bedeutung der gemessenen Antikörpertiter gegen die einzelnen Fusionsproteine zu verstehen, sollte die Lage der Aminosäuresequenzen an der Oberfläche des L-Asparaginase-Moleküls beachtet werden. Die räumliche Beziehung der Antikörperbindung zum aktiven Zentrum und der mobilen „loop“ des Enzyms liefern möglicherweise eine Erklärung für den Vorgang der „stillen Inaktivierung“.

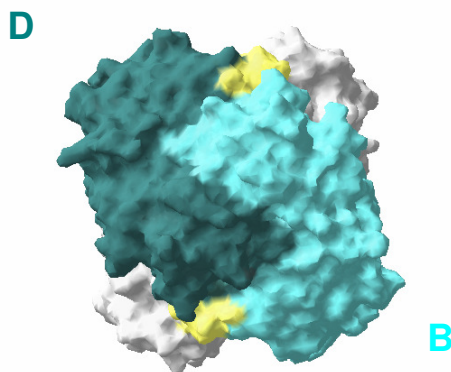


Abb. 48: Strukturmodell der *E. coli* L-Asparaginase. Farblich dargestellt sind Untereinheiten B (hellgrün) und D (dunkelgrün) mit zwei aktiven Zentren (gelb)

Abbildung 48 zeigt das Strukturmodell der *E. coli* L-Asparaginase bestehend aus vier identischen Monomeren mit einer jeweiligen Aminosäuresequenz von 1-326. Das aktive Enzym setzt sich als Tetramer aus vier solcher identischer Untereinheiten zusammen. Dabei bilden jeweils zwei Untereinheiten (A und C oder B und D) durch starke Wechselwirkungen Dimere, so dass das aktive Enzym eigentlich ein Dimer aus zwei Dimeren darstellt. Die vier aktiven Zentren werden jeweils von der N-terminalen Domäne der einen und der C-terminalen Domäne der anderen Untereinheit gebildet. Jedes aktive Zentrum besitzt eine mobile „loop“, die aus der Aminosäuresequenz 14-26 gebildet wird und sich nach Substratbindung schließt. Ohne geschlossene „loop“ findet kein Substratumsatz statt.

Zur Veranschaulichung der Lage am L-Asparaginase-Molekül sind in Abbildung 49 A die im epitopspezifischen Assay eingesetzten Proteinfragmente E (blau) und J (rot) farblich gekennzeichnet, der gelben Struktur entspricht die „loop“ im aktiven Zentrum, welches am gebundenen Aspartatrest (Asp) erkennbar ist. In diesem Bereich liegen die Peptidstrukturen der Proteinfragmente E und J. In Abbildung 49 B ist die Position von drei Epitopen, die sich im Bereich des aktiven Zentrums und der mobilen Klappe

befinden, dargestellt. Eine Bindung von spezifischen Antikörpern an diese Strukturen könnte zu einer Behinderung des Schließmechanismus der „loop“ führen und damit die Enzymaktivität beeinflussen. Möglicherweise liegt hier eine Erklärung für das Phänomen der „stillen Inaktivierung“.

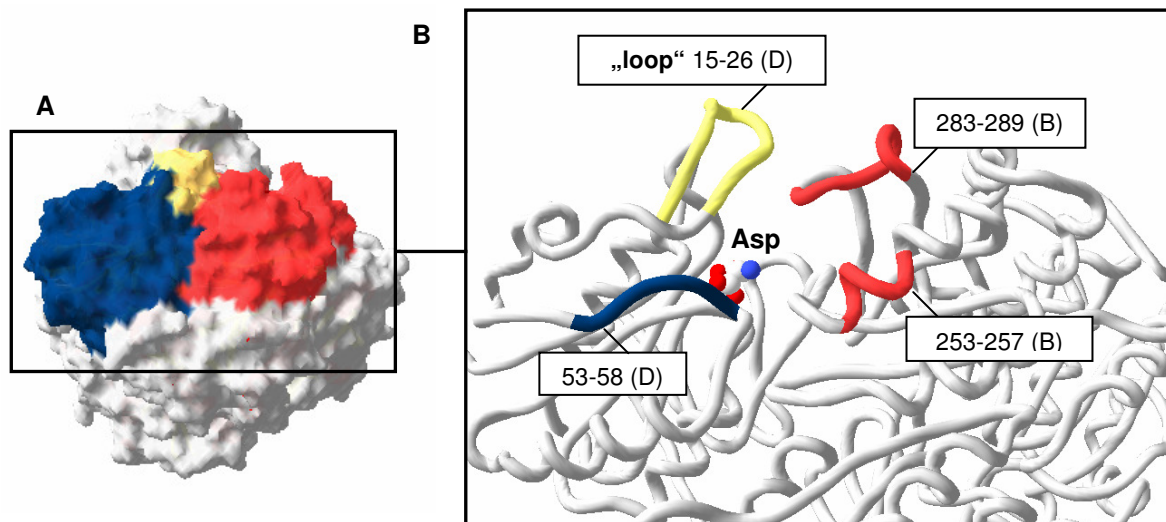


Abb. 49: Lage der Aminosäuresequenzen am L-Asparaginase-Molekül

5.3.2 „Stille Inaktivierung“ und Antikörpertiter gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein

Parallel zu den Messungen der Titer gegen die GST-Fusionsproteine wurde jede Patientenprobe auch auf Bindung von Antikörpern an das L-Asparaginase-Gesamtprotein untersucht. Dieses Vorgehen sollte einen direkten Vergleich zwischen den international publizierten Methoden, die das Gesamtprotein einsetzen, und unserer epitopspezifischen Methode ermöglichen. Für diesen Zweck wurde ein von Wang et al. (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA) veröffentlichter ELISA in modifizierter Form aufgebaut [84].

Wie bereits ausgeführt, wurde nach Abschluss unserer Messungen auf Daten aus dem Drug-Monitoring Programm des NOPHO-Studienkollektivs zurückgegriffen, in dem alle uns zur Verfügung stehenden Patientenproben bereits auf Antikörper gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein mit einer von Avramis et al. publizierten Methode gemessen wurden [9].

Das Hauptproblem der gegenwärtig zur Verfügung stehenden Assays stellen Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern im Serum und dem L-Asparaginase-Gesamtprotein dar. Diese Annahme wird durch die Bestimmung von L-Asparaginase-Antikörpern in Seren von Menschen ohne vorherigen Kontakt mit dem Medikament bestätigt [64]. Armstrong et al. konnten in einer Population von 350 gesunden Blutspendern, nativ gegenüber einer Gabe von PEG-Asparaginase, in 22-25% PEG-Asparaginase-Antikörper nachweisen [6]. Auch Albertsen et al. beobachteten das Auftreten von Antikörpern gegen *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase bei Patienten noch vor Therapiebeginn [46].

Dass eine Formation von Antikörpern gegen L-Asparaginase nicht zwingend zu einer immunologischen Reaktion führt, ist durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt worden [43,49,65]. Mit dem Auftreten von Antikörpern steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit, unter einer immunologischen Reaktion zu leiden, an [7,43]. Woo et al. konnten eine Zunahme des Risikos für klinische Reaktionen ab einem bestimmten Median des Antikörpertiters im Vergleich zur Gruppe der nicht reagierenden Patienten beobachten. Ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung einer klinischen Reaktion und der Höhe der Antikörperkonzentration ist nicht beschrieben [88].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Antikörpertiter gegen das Gesamtprotein zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Gruppe der therapeutischen Aktivität sowohl am Ende der Induktion als auch Reinduktion. Die hohe Standardabweichung (siehe Tabelle 8) in der Gruppe der therapeutischen Aktivität in der Induktion ist durch einen Ausreißerwert bedingt. Dieser Patient wies eine Antikörperbildung gegen L-Asparaginase bei immunologischer Reaktion ohne Abfall der Enzymaktivität bzw. klinischer Reaktion auf, die sich in Titer gegen das Gesamtprotein und das GST-Fusionsprotein E äußerte.

Graphisch dargestellt zeigte sich für die Gruppe der Patienten mit therapeutischer Aktivität und „stiller Inaktivierung“ ein grundsätzlich unterschiedlicher Verlauf der Antikörpertiter. Während bei nicht reagierenden Patienten ein konstanter Verlauf beobachtet werden konnte, stiegen die Antikörpertiter der Patienten mit Enzyminaktivierung an. Patienten mit einer „stillen Inaktivierung“ bildeten statistisch signifikant mehr Antikörpertiter gegen L-Asparaginase als Patienten mit einer therapeutischen Aktivität am Ende der Reinduktion. Lediglich zwei Patienten (n=2/19; 10,5%) zeigten relativ konstante Titerverläufe. Nur in einem Fall von „stiller Inaktivierung“ (n=1/19,

5,3%) konnte kein Titer gegen das Gesamtprotein nachgewiesen werden, obwohl der Patient Antikörper gegen das GST-Fusionsprotein J im Serum vorliegen hatte.

Der Einfluss von Kreuzreaktionen war entgegen der Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen in der vorliegenden Untersuchung nur gering. In der Gruppe der Kontrollproben konnte keine relevante Antikörperbindung nachgewiesen werden. Lediglich ein Patient (n=1/23; 4,3%) mit therapeutischer Aktivität zeigte bereits am Ende der Induktion einen Titer sowohl gegen das Gesamtprotein als auch gegen das GST-Fusionsprotein E. Wahrscheinlich beruhten die Antikörpertiter auf primär gegen andere Proteine gerichteten Antikörpern im Serum des Patienten. Die Messung von Antikörpern gegen L-Asparaginase noch vor Therapiebeginn ist ein bekanntes Phänomen [43,46,50].

Im Vergleich zu anderen publizierten Arbeiten sind die Ergebnisse der Untersuchungen insofern überraschend, dass der Einfluss von Kreuzreaktionen nur gering bleibt. Weiterhin konnte nur bei einem Patienten mit „stiller Inaktivierung“ kein Antikörpertiter gegen das Gesamtprotein nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür lässt sich nicht finden. Interessant wäre es, weitere prospektive Untersuchungen mit Serumproben eines anderen Patientenkollektivs mit der gleichen Methode durchzuführen.

Auch wenn die Ergebnisse der Messung von Antikörpern gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein durchaus eine Korrelation zwischen einem Titer gegen das Gesamtprotein und einer „stillen Inaktivierung“ zeigte, führen Kreuzreaktionen und damit der Nachweis von Antikörpern, die im Rahmen immunologischer Reaktionen unbedeutend sind, zu einer Einschränkung der prognostischen Aussagekraft der Assays. Daher ist die Identifizierung spezifischer Antikörper, die für klinische Reaktionen und den Mechanismus der „stillen Inaktivierung“ verantwortlich sind, von großer Bedeutung für die Optimierung der Messmethoden.

5.4 Ausblick

Mit der Weiterentwicklung von Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen L-Asparaginase würde sich ein hoher klinischer Nutzen für die Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie verbinden. Ein Antikörper-Assay, welcher es ermöglicht, spezifische, an einer klinischen Reaktion oder rapiden Enzyminaktivierung beteiligte Antikörper zu bestimmen, könnte zu einer unmittelbaren Verbesserung der Therapiekontrolle beitragen.

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Entwicklung und Evaluierung eines Antikörper-Assays, der im klinischen Alltag einfach und effizient den immunologischen Status eines Patienten erfasst. Als Instrument innerhalb eines Drug-Monitoring Programms konnte sich jedoch noch kein Assay durchsetzen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern einen Hinweis auf mögliche Epitope, welche im Rahmen einer „stillen Inaktivierung“ eine Rolle spielen könnten. Sie bieten eine Grundlage für die Weiterentwicklung und den Aufbau eines epitopspezifischen ELISA. Es muss jedoch klar herausgestellt werden, dass sie nur einen Zwischenschritt auf dem Weg zur Entwicklung und Etablierung darstellen.

Zukünftige Arbeiten sollten sich mit einer weiteren Eingrenzung und Spezifizierung der Epitope befassen, um den Antikörper-Assay noch selektiver zu gestalten und eine Bindung von unspezifischen Antikörpern an die Proteinfragmente auszuschließen. In einer prospektiven Untersuchung könnte die klinische Relevanz der Epitope bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von den Ergebnissen des „Epitop Mappings“ [78] die Aminosäuresequenzen linearer Epitope zur Herstellung der Fusionsproteine verwendet. Diese Epitope werden auch als kontinuierlich bezeichnet, da sie aus Aminosäuren gebildet werden, die in ihrer Sequenz aufeinander folgen. Auch nach einer Denaturierung bleiben sie bestehen. Weiterhin gibt es diskontinuierliche Epitope, auch konformativ genannt, welche bedingt durch die Ausbildung der Tertiärstruktur aus verschiedenen räumlich nah beieinander liegenden Aminosäuren entstehen. In der Sequenzabfolge können diese voneinander entfernt sein. In der Regel besitzen Antigene mehrere Epitope mit jeweils spezifisch dagegen gerichteten Antikörpern. Da es nicht auszuschließen ist, dass auch am L-Asparaginase-Protein diskontinuierliche Epitope eine Rolle bei immunologischen Reaktionen spielen, wurden bereits Überlegungen angestellt, die Suche auch auf diese Epitope auszudehnen. Über

eine mögliche Ausbildung von diskontinuierlichen Epitopen an den Fusionsproteinen kann nur spekuliert werden.

Da in erster Linie die Ausbildung der Tertiärstruktur der Proteinfragmente problematisch ist und eine teilweise erhebliche Bindung an das GST-Protein vorlag, könnten in weiteren Versuchen die Proteinfragmente ohne GST als Antigen im ELISA eingesetzt werden. Erste Arbeiten zeigten ermutigende Ergebnisse und bewiesen die Eignung der Fragmente nach Abtrennung des Fusionsproteins als suffiziente Antigene. Weitere Entwicklungsmöglichkeiten liegen in der Verwendung anderer Fusionspartner wie beispielsweise (His)₆ tag.

Es bleibt festzustellen, dass bis zum Einsatz eines L-Asparaginase-Antikörper-Assays in der klinischen Routine ein Monitoring der Enzymaktivität zur Therapiekontrolle in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie unerlässlich ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Abshire TC, Pollock BH, Billett AL, Bradley P, Buchanan GR (2000): Weekly polyethylene glycol conjugated L-asparaginase compared with biweekly dosing produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 96(5):1709-15
- [2] Adamson RH, Fabro S (1968): Antitumor activity and other biologic properties of L-asparaginase (NSC-109229) - a review. *Cancer Chemother Rep* 52(6):617-26
- [3] Albertsen BK, Schroder H, Ingerslev J, Jakobsen P, Avramis VI, Muller HJ, Carlsen NT, Schmiegelow K (2001): Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase and asparaginase Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system. *Br J Haematol* 115(4):983-90
- [4] Albertsen BK, Schroder H, Jakobsen P, Muller HJ, Carlsen NT, Schmiegelow K (2001): Monitoring of *Erwinia* asparaginase therapy in childhood ALL in the Nordic countries. *Br J Clin Pharmacol* 52(4):433-7
- [5] Appel IM, den Boer ML, Meijerink JPP, Veerman AJP, Reniers NCM, Pieters R (2006): Upregulation of asparagin synthetase expression is not linked to the clinical response to L-asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 107(11):4244-9
- [6] Armstrong JK, Hempel G, Koling S, Chan LS, Fisher T, Meiselman HJ, Garraty G (2007): Antibody against poly(ethylen glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 110(1):103-11
- [7] Asselin BL, Whitin JC, Coppola DJ, Rupp IP, Sallan SE, Cohen HJ (1993): Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol* 11(9):1780-86
- [8] Asselin BL (1999): The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. *Adv Exp Med Biol* 457:621-9
- [9] Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sather H, Bostrom BC, Cohen LJ, Ettinger AG, Ettinger LJ, Franklin J, Gaynon PS, Hilden JM, Lange B, Majlessipour F, Mathew P, Needle M, Neglia J, Reaman G, Holcenberg JS, Stork L (2002): A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 99(6):1986-94
- [10] Avramis VI, Panosyan EH (2005): Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet* 44(4):367-93
- [11] Beard ME, Crowther D, Galton DA, Guyer RJ, Hamilton Fairley GH, Kay HE, Knapton PJ, Malpas JS, Bodley Scott R (1970): L-asparaginase in treatment of acute leukaemia and lymphosarcoma. *Br Med J* 1(5690):191-5
- [12] Becker FF, Broome JD (1969): L-asparaginase: inhibition of endogenous RNA polymerase activity in regenerating liver. *Arch Biochem Biophys* 130(1):332-6
- [13] Billett AL, Carls A, Gelber RD, Sallan SE (1992): Allergic reactions to *Erwinia* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to *Escherichia coli* asparaginase. *Cancer* 70(1):201-6
- [14] Blau B, Klug-Albertsen B, Schroder H, Röhm KH, Müller HJ (2003): Development of an epitope-specific assay for anti-asparaginase antibodies in serum of pediatric patients treated with *E. coli* Asparaginase for acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Blood* 102(11):251b Abstract 4730

- [15] Boos J, Werber G, Ahlke E, Schulze-Westhoff P, Nowak-Göttl U, Würthwein G, Verspohl EJ, Ritter J, Jürgens H (1996): Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer* 32A (9): 1544-50
- [16] Broome JD (1961): Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature* 191:1114-1115
- [17] Broome JD (1963): Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *J Exp Med* 118:99-120
- [18] Broome JD (1968): Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. Effects of the enzyme on asparagine levels in the blood, normal tissues, and 6C3HED lymphomas of mice: differences in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and -resistant lymphoma cells. *J Exp Med* 127(6):1055-72
- [19] Campbell HA, Mashburn LT (1969): L-asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. *Biochemistry* 8(9):3768-75
- [20] Capizzi RL, Bertino JR, Skeel RT, Creasey WA, Zanes R, Olayon C, Peterson RG, Handschumacher RE (1971): L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann Intern Med* 74(6):893-901
- [21] Chen J, Wei Y, Jia R, Wang M, Wu W (2006): Probing the antigenicity of *E. coli* L asparaginase by mutational analysis. *Mol Biotech* 33(1):57-65
- [22] Cheung NK, Chau IY, Coccia PF (1986): Antibody response to *Escherichia coli* L-asparaginase. Prognostic significance and clinical utility of antibody measurement. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 8(2):99-104
- [23] Clarkson B, Krakoff I, Burchenal J, Karnofsky D, Golbey R, Dowling M, Oettgen H, Lipton A (1970): Clinical results of treatment with *E. coli* Asparaginase in adults with leukemia, lymphoma, and solid tumors. *Cancer* 25(2):279-305
- [24] Clementi A (1922): Désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans 1 organisme. *Arch Int Physiol* 19:369-398
- [25] Dellinger CT, Miale TD (1976): Comparison of anaphylactic reactions to asparaginase derived from *Escherichia coli* and from *Erwinia* cultures. *Cancer* 38(4):1843-6
- [26] Duval M, Suci S, Ferster A, Rialland X, Nelken B, Lutz P, Benoit Y, Robert A, Manel AM, Vilmer E, Otten J, Philippe N (2002): Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* 99(8):2734-9
- [27] Eden OB, Shaw MP, Lilleyman JS, Richards S (1990): Non-randomised study comparing toxicity of *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukaemia. *Med Pediatr Oncol* 18(6):497-502
- [28] Etttinger LJ, Asselin B, Poplack DG, Kurtzberg J (1993): Toxicity profile of PEG-L-Asparaginase in native-L-Asparaginase hypersensitive and non-hypersensitive patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Med Pediatr Oncol* 21:556 Abstract
- [29] Evans WE, Tsatis A, Rivera G, Murphy SB, Dahl GV, Denison M, Crom WR, Barker LF, Mauer AM (1982): Anaphylactoid reactions to *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukemia and lymphoma. *Cancer* 49(7):1378-83

- [30] Fabry U, Korholz D, Jurgens H, Gobel U, Wahn V (1985): Anaphylaxis to L-asparaginase during treatment for acute lymphoblastic leukemia in children- evidence of a complement-mediated mechanism. *Pediatr Res* 19(4):400-8
- [31] Fernandes AI, Gregoriadis G (2001): The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics. *Int J Pharm* 217(1-2):215-24
- [32] Gaspar MM, Perez-Soler R, Cruz ME (1996): Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations. *Cancer Chemother Pharmacol* 38(4):373-7
- [33] Graham ML (2003): Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev* 55(10):1293-302
- [34] Haskell CM, Canellos GP, Leventhal BG, Carbone PP, Block JB (1969): L-asparaginase resistance in human leukemia- asparaginase synthetase. *Biochem Pharmacol* 18(10):2578-80
- [35] Ho DH, Yap HY, Brown N, Benjamin RS, Friereich EJ, Blumenschein GR, Bodey GP (1981): Clinical pharmacology of intramuscularly administered L-asparaginase. *J Clin Pharmacol* 21(2):72-8
- [36] Ho DH, Brown NS, Yen A, Holmes R, Keating M, Abuchowski A, Newman RA, Krakoff IH (1986): Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase. *Drug Metab Dispos* 14(3):349-52
- [37] Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D (2007): Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to Asparaginase. *J Clin Invest* 117(4):1049-57
- [38] Jaffe N, Traggis D, Das L, Moloney WC, Hann HW, Kim BS, Nair R (1971): L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases in children. *Cancer Res* 31(7): 942-9
- [39] Jarrar M, Gaynon PS, Periclou AP, Fu C, Harris RE, Stram D, Altman A, Bostrom B, Breneman J, Steele D, Trigg M, Zipf T, Avramis VI (2006): Asparagine depletion after pegylated *E. coli* asparaginase treatment and induction outcome in children with acute lymphoblastic leukemia in first bone marrow relapse: A Children's Oncology Group study (CCG-1941). *Pediatr Blood Cancer* 47(2):141-6
- [40] Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH (1993): L-asparaginase and PEG asparaginase--past, present, and future. *Leuk Lymphoma* 10 Suppl:153-7
- [41] Kidd JG (1953a): Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum, I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum or rabbit serum. *J Exp Med* 98(6):565-82
- [42] Kidd JG (1953b): Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum, II. Studies on the nature of the active serum constituent: histological mechanism of the regression: tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells, in vitro discussion. *J Exp Med* 98(6):583-606
- [43] Killander D, Dohlwitz A, Engstedt L, Franzen S, Gahrton G, Gullbring B, Holm G, Holmgren A, Hoglund S, Killander A, Lockner D, Mellstedt H, Moe PJ, Palmblad J, Reizenstein P, Skarberg KO, Swedberg B, Uden AM, Wadman B, Wide L, Ahstrom L (1976): Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer* 37(1):220-8
- [44] Klug Albertsen B, Jakobsen P, Schröder H, Schmiegelow K, Carlsen NT (2001): Pharmacokinetics of *Erwinia* asparaginase after intravenous and intramuscular administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 48(1):77-82

- [45] Klug Albertsen B, Schmiegelow K, Schroder H, Carlsen NT, Rosthoj S, Avramis VI Jakobsen P (2002): Anti-*Erwinia* asparaginase antibodies during treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia and their relationship to outcome: a case control study. *Cancer Chemother Pharmacol* 50(2):117-20
- [46] Klug Albertsen B, Schröder H, Jakobsen P, Avramis VI, Muller HJ, Schmiegelow K, Carlsen NT (2002): Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase. *Med Pediatr Oncol* 38(5):310-6
- [47] Korholz D, Urbanek R, Nurnberger W, Jobke A, Gobel U, Wahn V (1987): Formation of specific IgG antibodies in L-asparaginase treatment. Distribution of IgG subclasses. *Monatsschr Kinderheilkd* 135(6):325-8
- [48] Kozak M, Jurga S (2002): A comparison between the crystal and solution structures of *Escherichia coli* asparaginase II. *Acta Biochim Pol* 49(2):509-13
- [49] Kurtzberg J, Asselin B, Pollack B, Bernstein M, Buchanan G, The Pediatric Oncology Group (1993): PEG-L-asparaginase (PEGasp) vs. native *E. coli asparaginase* (asp) for reinduction of relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL): Pediatric Oncology Group (POG) 8866 Phase II trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 12:325 Abstract 1079
- [50] Kurtzberg J, Asselin B, Poplack D, Grebanier A, Chen R, Franklin A, Scudieri D, Fisherman J (1993): Antibodies to asparaginase alter pharmacokinetics and decrease enzyme activity in patients on asparaginase therapy. *Proc Am Assoc Cancer Res* 34:304 Abstract 1807
- [51] Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5
- [52] Larson RA, Fretzin MH; Dodge RK, Schiffer CA (1998): Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 12(5):660-5
- [53] Mashburn LT, Wriston JC (1964): Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 105:450-2
- [54] Miller HK, Salser JS, Balis ME (1969): Amino acids levels following L-asparaginase amidohydrolase (EC.3.5.1.1). *Cancer Res* 29(1):183-7
- [55] Moola ZB, Scawn MD, Atkinson T, Nicholls DJ (1994): *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochem J* 302:921-7
- [56] Muller HJ, Boos J (1998): Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol* 28(2):97-113
- [57] Muller HJ, Loning L, Horn A, Schwabe D, Gunkel M, Schrappe M, von Schutz V, Henze G, Casimiro da Palma J, Ritter J, Pinheiro JP, Winkelhorst M, Boos J (2000): Pegylated asparaginase (Oncaspar) in children with ALL: drug monitoring in reinduction according to the ALL/NHL-BFM 95 protocols. *Br J Haematol* 110(2):379-84
- [58] Muller HJ, Beier R, Loning L, Blutters-Sawatzki R, Dorffel W, Maass E, Muller-Wehrich S, Scheel-Walter HG, Scherer F, Stahnke K, Schrappe M, Horn A, Lumkemann K, Boos J (2001): Pharmacokinetics of native *Escherichia coli* asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment. *Br J Haematol* 114(4):794-9
- [59] Muller HJ, Beier R, da Palma JC, Lanvers C, Ahlke E, von Schutz V, Gunkel M, Horn A, Schrappe M, Henze G, Kranz K, Boos J (2002): PEG-asparaginase (Oncaspar) 2500 U/m(2) BSA in reinduction and relapse treatment in the ALL/NHL-BFM protocols. *Cancer Chemother Pharmacol* 49(2):149-54

- [60] Narta UK, Kanwar SS, Azmi W (2007): Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 61(3):208-21
- [61] Nesbit M, Chard R, Evans A, Karon M, Hammond GD (1979): Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1(1):9-13
- [62] Oettgen HF, Stephenson PA, Schwartz MK, Leeper RD, Tallal L, Tan CC, Clarkson BD, Golbey RB, Krakoff IH, Karnofsky DA, Murphy ML, Burchenal JH (1970): Toxicity of *E.coli* L-asparaginase in man. *Cancer* 25(2): 253-78
- [63] Ohnuma T, Holland JF, Meyer P (1972): *Erwinia carotovora* asparaginase in patients with prior anaphylaxis to asparaginase from *E. coli*. *Cancer* 30(2):376-81
- [64] Unpublizierte Daten, persönliche Information von J. Otten, EORTC an H.-J. Müller
- [65] Panosyan EH, Seibel NL, Martin-Aragon S, Gaynon PS, Avramis IA, Sather H, Franklin J, Nachman J, Ettinger LJ, La M, Steinherz P, Cohen LJ, Siegel SE, Avramis VI; Children's Cancer Group Study CCG-1961 (2004): Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *J Pediatr Hematol Oncol* 26(4):217-26
- [66] Park YK, Abuchowski A, Davis S, Davis F (1981): Pharmacology of *Escherichia coli*-L-asparaginase polyethylene glycol adduct. *Anticancer Res* 1(6):373-6
- [67] Pui CH, Evans WE (1998): Acute lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med* 339(9):605-15
- [68] Pui CH, Evans WE (2006): Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354(2):166-78
- [69] von Randow J (2003): Entwicklung eines Antikörper-Assays zur Risikoabschätzung anaphylaktischer Reaktionen sowie der Inaktivierungswahrscheinlichkeit des Enzyms L-Asparaginase in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie. Med. Dissertation, Universität Marburg
- [70] Riccardi R, Holcenberg JS, Glaubiger DL, Wood JH, Poplack DG (1981): L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. *Cancer Res* 41:4554-8
- [71] Rizzari C, Citterio M, Zucchetti M, Conter V, Chiesa R, Colombini A, Malguzzi S, Silvestri D, D'Incalci M (2006): A pharmacological study on pegylated Asparaginase used in front-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 91(1):24-31
- [72] Rosen O, Muller HJ, Gokbuget N, Langer W, Peter N, Schwartz S, Hahling D, Hartmann F, Ittel TH, Muck R, Rothmann F, Arnold R, Boos J, Hoelzer D (2003): Pegylated asparaginase in combination with high-dose methotrexate for consolidation in adult acute lymphoblastic leukaemia in first remission: a pilot study. *Br J Haematol* 123(5):836-41
- [73] Sallan SE, Hitchcock-Bryan S, Gelber R, Cassady JR, Frei E, Nathan DG (1983): Influence of intensive Asparaginase in the treatment of childhood non-T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 43(11):5601-7
- [74] Schagger H, von Jagow G (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166(2):368-379
- [75] Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeyer C, Henze G, Feldges A, Zintl F, Kornhuber B, Ritter J, Welte K, Gadner H, Riehm H (2000): Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite

- reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. Blood 95(11):3310-22
- [76] Sobin LH, Kidd JG (1965): A metabolic difference between two lines of lymphoma 6C3HED cells in relation to Asparaginase. Proc Soc Exp Biol Med 119:325-7
 - [77] Stams WA, den Boer ML, Beverloo B, Meijerink JP, Stigter RL, van Wering ER, Janka-Schaub GE, Slater R, Pieters R (2003): Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. Blood 101(7): 2743-7
 - [78] Swain AL, Jaskolski M, Housset D, Rao JK, Wlodawer A (1993): Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. Proc Natl Acad Sci USA 90(4):1474-8
 - [79] Ueno T, Ohtawa K, Mitsui K, Kodera Y, Hiroto M, Matsushima A, Inada Y, Nishimura H (1997): Cell cycles arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. Leukemia 11(11):1858-61
 - [80] Vieira Pinheiro JP, Lanvers C, Wurthwein G, Beier R, Casimiro Da Palma J, von Stackelberg A, Boos J (2002): Drug monitoring of PEG-Asparaginase treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia and Non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma 43(10):1911-20
 - [81] Vieira Pinheiro JP, Boos J (2004): The best way to use asparaginase in childhood acute lymphatic leukaemia-still to be defined? Br J Haematol 125(2):117-27
 - [82] Wade HE, Elsworth R, Herbert D, Keppie J, Sargeant K (1968): A new L-asparaginase with antitumour activity. Lancet 2(7571):776-7
 - [83] Wade HE, Robinson HK, Philips BW (1971): Asparaginase and glutaminase activities of bacteria. J Gen Microbiol 69(3):299-312
 - [84] Wang B, Hak LJ, Relling MV, Pui CH, Woo MH, Storm MC (2000): ELISA to evaluate plasma anti-asparaginase IgG concentrations in patients with acute lymphoblastic leukemia. J Immunol Methods 239(1-2):75-83
 - [85] Wang B, Relling MV, Storm WC, Woo MH, Ribeiro R, Pui CH, Hak LJ (2003): Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. Leukemia 17(8):1583-8
 - [86] Whitecar JP Jr, Bodey GP, Harris JE, Freireich EJ (1970): L-asparaginase. N Engl J Med 282(13):732-4
 - [87] Werner A, Rohm KH, Muller HJ (2005): Mapping of B-cell epitopes in *E.coli* asparaginase II, an enzyme used in leukemia treatment. Biol Chem 386(6):535-40
 - [88] Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Evans WE, Sandlund JT, Rivera GK, Wang B, Pui CH, Relling MV (1998) Anti-asparaginase antibodies following *E. coli* asparaginase therapy in pediatric acute lymphoblastic leukaemia. Leukemia 12(10):1527-33
 - [89] Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Harrison PL, Wang B, Evans WE, Pui CH, Relling MV (2000): Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 18(7):1525-32
 - [90] Wriston JC, Yellin TO (1973): L-asparaginase: A review. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 39:185-248
 - [91] Yellin TO, Wriston JC (1966): Purification and properties of guinea pig serum asparaginase. Biochemistry 5(5):1605-12

- [92] Zalewska-Szewczyk B, Andrzejewski W, Bodalski J (2004): Development of anti-asparaginase antibodies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 43(5):600-2
- [93] Zalewska-Szewczyk B, Andrezejewski W, Mlynarski W, Jedrychowska-Danska K, Witas H, Bodalski J (2007): The anti-asparagines antibodies correlate with l-asparagines activity and may affect clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 48(5): 931-6

ANHANG

6.1 Peptidsequenzen

Fragment E

```

1 - TTACCCAATATCACCATTTTAGCAACCGCGGGACCATTGCCGGTGGTGGTACTCCGCA - 60
  - L P N I T I L A T G G T I A G G G D S A
61 - ACCAAATCTAACTACACCGCGGGTAAAGTTGGCGTAGAAAATCTGGTTAATGCGGTGCCG - 120
  - T K S N Y T A G K V G V E N L V N A V P
121 - CAACTAAAAGACATTGCGAACGTTAAAGGCGAGCAGGTAGTGAATATCGGCTCCCAGGAC - 180
  - Q L K D I A N V K G E Q V V N I G S Q D
181 - ATGAACGATGACGTCTGGCTGACACTGGCGAAAAAATTAACACCGACTGCGATAAGACC - 240
  - M N D D V W L T L A K K I N T D C D K T
241 - GACGGCTTCGTCATTACCCACGGTACCGACACGATGGAAGAACTGCTTACTTCCTCGAC - 300
  - D G F V I T H G T D T M E E T A Y F L D
301 - CTGACGGTGAAATGCGACAAACCGGTGGTGTGGTTCGGCGCAATGCGTCCGTCACGTCT - 360
  - L T V K C D K P V V M V G A M R P S T S
361 - ATGAGCGCAGACGGTCCATTCAACCTGTATAACGCGGTAGTGACCGCA - 408
  - M S A D G P F N L Y N A V V T A X

```

Fragment F

```

1 - TACACCGCGGGTAAAGTTGGCGTAGAAAATCTGGTTAATGCGGTGCCGCAACTAAAAGAC - 60
  - Y T A G K V G V E N L V N A V P Q L K D
61 - ATTGCGAACGTTAAAGGCGAGCAGGTAGTGAATATCGGCTCCCAGGACATGAACGATGAC - 120
  - I A N V K G E Q V V N I G S Q D M N D D
121 - GTC - 123
  - V X

```

Fragment G

```

1 - ATGAGCGCAGACGGTCCATTCAACCTGTATAACGCGGTAGTGACCGCAGCAGATAAAGCC - 60
  - M S A D G P F N L Y N A V V T A A D K A
61 - TCCGCCAACCGTGGCGTGCTGGTAGTGATGAATGACACCGTGCTTGATGGCCGTGACGTC - 120
  - S A N R G V L V V M N D T V L D G R D V
121 - ACCAAAACCAACACC - 135
  - T K T N T X

```

Fragment H

```

1 - TTCAAGTCTGTAACTACGGTCCTCTGGGTTACATTACAAACGGTAAGATTGACTACCAG - 60
  - F K S V N Y G P L G Y I H N G K I D Y Q
61 - CGTACCCCGGCACGTAAGCATACCAGCGACACGCCATTGATGTCTCTAAGCTGAATGAA - 120
  - R T P A R K H T S D T P F D V S K L N E
121 - CTGCCGAAAGTCGGCATTGTTTATAACTAC - 150
  - L P K V G I V Y N Y X

```

Fragment J

```

1 - GTCGGCATTGTTTATAACTACGCTAACGCATCCGATCTTCCGGCTAAAGCACTGGTAGAT - 60
  - V G I V Y N Y A N A S D L P A K A L V D
61 - GCGGGCTATGATGGCATCGTTAGCGCTGGTGTGGGTAACGGCAATCTCTATAAACTGTG - 120
  - A G Y D G I V S A G V G N G N L Y K T V
121 - TTCGACACGCTGGCGACCGCCGCGAAAAACGGTACTGCAGTCGTGCGTTCTTCCCGCGTA - 180
  - F D T L A T A A K N G T A V V R S S R V
181 - CCGACGGGCGCTACCACTCAGGATGCCGAAGTGGATGATGCGAAATACGGCTTCGTGCGC - 240
  - P T G A T T Q D A E V D D A K Y G F V A
241 - TCTGGCACGCTGAACCCGCAAAAAGCGCGCGTTCTGCTGCAACTGGCTCTGACGCAAACC - 300
  - S G T L N P Q K A R V L L Q L A L T Q T
301 - AAAGATCCGCAGCAGATCCAGCAGATCTTCAATCAGTAC - 339
  - K D P Q Q I Q Q I F N Q Y X

```

Fragment K

```
1 - GATGGCATCGTTAGCGCTGGTGTGGGTAACGGCAATCTCTATAAACTGTGTTTCGACACG - 60
  - D G I V S A G V G N G N L Y K T V F D T
61 - CTGGCGACCGCCGCGAAAAACGGTACTGCAGTCGTGCGTTCTTCCCGC - 108
  - L A T A A K N G T A V V R S S R X
```

6.2 Primersequenzen

Fragment E

```
for5' CG GGA TCC TTA CCC AAT ATC ACC ATT 3'
rev5' AAC GCG GTA GTG ACC GCA TAA TGA GAA TTC C 3'
```

Fragment F

```
for5' CG GGA TCC TAC ACC GCG GGT AAA GTT 3'
rev5' GAC ATG AAC GAT GAC GTC TAA TGA GAA TTC C 3'
```

Fragment G

```
for5' CG GGA TCC ATG AGC GCA GAC GGT CCA 3'
rev5' GTC ACC AAA ACC AAC ACC TAA TGA GAA TTC C 3'
```

Fragment H

```
for5' CG GGA TCC TTC AAG TCT GTT AAC TAC 3'
rev5' GGC ATT GTT TAT AAC TAC TAA TGA GAA TTC C 3'
```

Fragment J

```
for5' CG GGA TCC GTC GGC ATT GTT TAT AAC 3'
rev5' CAG ATC TTC AAT CAG TAC TAA TGA GAA TTC C 3'
```

Fragment K

```
for5' CG GGA TCC GAT GGC ATC GTT AGC GCT 3'
rev5' GTC GTG CGT TCT TCC CGC TAA TGA GAA TTC C 3'
```

6.3 Sequenz Vektor pGEX-6P-3

```
ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGT
GCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCG
CCGACATCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAAT
GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGTATTCATGTCCCTATACTAGGTTATTG
GAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCAT
TTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATC
TTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAA
GCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGAT
ATTAGATACGGTGTTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCA
AGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTGCAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGT
AACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGAT
GCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCACAAATTGATAAGTACTTGAAAT
CCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAA
ATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCCCGAATTCCTGGGTGCGACTCGAGCGGCCGC
ATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCT
CCCGGAGACGGTTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCG
GGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGATAATTCTTGAA
```

GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTC
 AGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATG
 TATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTC
 AACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTTGCTCAGCCAGAAAC
 GCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAC
 AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC
 TATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCA
 GAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA
 TGCAGTGTCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGA
 AGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCT
 GAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA
 CTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAG
 TTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
 GCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC
 ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTA
 AGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATT
 TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTT
 CACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCT
 GCTGCTTGCAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCT
 TTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTA
 GGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
 CTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCG
 GTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
 CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCG
 GCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGT
 CGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGAGCCATGGA
 AACGCTTACGACCAACGCGCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCTACATGTTCTTTCTCTG
 CGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCG
 AACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTTCTCCTTACG
 CATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATAAATTCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTTCGCGGTATGG
 CATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACAGTAACGTTATACGATGTCGC
 AGAGTATGCCGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAA
 ACGCGGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCTGGCACAACAAGTGG
 CGGGCAAACAGTCGTTGTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTGCGAAATTGT
 CGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGC
 GTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATC
 CGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGT
 CTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCAT
 CTGGTGCATTGGGTACACAGCAAATCGCGCTGTAGCGGGCCATTAAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGC
 GTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTG
 GAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTG
 GTTGCCAAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGC
 ATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTCAACCACCATCAA
 ACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAACAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTG
 AAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAGAAAAAACCACCTGGCGCCCAATACGCAAAACCG
 CCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGTTTTCCCGACTGGAAGCGGGCA
 GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCC
 GGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
 GGATTCACTGGCCGTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTT
 GCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGT
 TGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAGCTGGCT
 GGAGTGCATCTTCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCTTCAAACCTGGCAGATGCACGTTACGATGCG
 CCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATACGTCATCCGCCGTTTGTTCACCGGAGAATCCGACGG
 AOGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCAATTTTTT
 GATGGCGTTGGAATT

Referenz:

[http://www.jp.amershambiosciences.com/tech_support/tech_material/pgex_](http://www.jp.amershambiosciences.com/tech_support/tech_material/pgex_seq/pgex_6p3.html)
[seq/pgex_6p3.html](http://www.jp.amershambiosciences.com/tech_support/tech_material/pgex_seq/pgex_6p3.html)

6.4 Sequenz *E. coli* L-Asparaginase (Asparaginase medac)

```

1 - TTACCCAATATCACCATTTTAGCAACCGCGGGACCATTGCCGGTGGTGGTGA CTCCGCA - 60
  - L P N I T I L A T G G T I A G G G D S A
61 - ACCAAATCTAACTACACCGCGGGTAAAGTTGGCGTAGAAAATCTGGTTAATGCCGGTGCCG - 120
  - T K S N Y T A G K V G V E N L V N A V P
121 - CAACTAAAAGACATTGCGAACGTTAAAGGCGAGCAGGTAGTGAATATCGGCTCCCAGGAC - 180
  - Q L K D I A N V K G E Q V V N I G S Q D
181 - ATGAACGATGACGTCTGGCTGACACTGGCGAAAAAATTAACACCGACTGCGATAAGACC - 240
  - M N D D V W L T L A K K I N T D C D K T
241 - GACGGCTTCGTCATTACCCACGGTACCGACACGATGGAAGAACTGCTTACTTCCTCGAC - 300
  - D G F V I T H G T D T M E E T A Y F L D
301 - CTGACGGTGAAATGCGACAAACCGGTGGTGTGGTTCGGCGCAATGCGTCCGTCCAGTCT - 360
  - L T V K C D K P V V M V G A M R P S T S
361 - ATGAGCGCAGACGGTCCATTCAACCTGTATAACCGGTTAGTGACCGCAGCTGATAAAGCC - 420
  - M S A D G P F N L Y N A V V T A A D K A
421 - TCCGCCAACCGTGGCGTGCTGGTAGTGATGAATGACACCGTGCTTGATGGCCGTGACGTC - 480
  - S A N R G V L V V M N D T V L D G R D V
481 - ACCAAAACCAACACCACCGAGCTAGCGACCTTCAAGTCTGTAACTACGGTCCTCTGGGT - 540
  - T K T N T T D V A T F K S V N Y G P L G
541 - TACATTACAACGGTAAGATTGACTACCAGCGTACCCCGGCACGTAAGCATACCAGCGAC - 600
  - Y I H N G K I D Y Q R T P A R K H T S D
601 - ACGCCATTTCGATGTCTCTAAGCTGAATGAACTGCCGAAAGTCGGCATTGTTTATAACTAC - 660
  - T P F D V S K L N E L P K V G I V Y N Y
661 - GCTAACGCATCCGATCTTCCGGCTAAAGCACTGGTAGATGCGGGCTATGATGGCATCGTT - 720
  - A N A S D L P A K A L V D A G Y D G I V
721 - AGCGCTGGTGTGGGTAACGGCAATCTCTATAAACTGTGTTTCGACACGCTGGCGACCGCC - 780
  - S A G V G N G N L Y K T V F D T L A T A
781 - GCGAAAAACGGTACTGCAGTCGTGCGTTCTTCCCGGTACCGACGGGCGCTACCACTCAG - 840
  - A K N G T A V V R S S R V P T G A T T Q
841 - GATGCCGAAGTGGATGATGCGAAATACGGCTTCGTCGCCTCTGGCACGCTGAACCCGCAA - 900
  - D A E V D D A K Y G F V A S G T L N P Q
901 - AAAGCGCGCTTCTGCTGCAACTGGCTCTGACGCAAACCAAAGATCCGCAGCAGATCCAG - 960
  - K A R V L L Q L A L T Q T K D P Q Q I Q
961 - CAGATCTTCAATCAGTAC - 978
  - Q I F N Q Y X

```


Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturmodell der <i>E. coli</i> L-Asparaginase. Dargestellt sind die vier identischen Untereinheiten A (dunkelblau), C (hellblau), B (hellgrün) und D (dunkelgrün)	4
Abb. 2: Hydrolyse von L-Asparagin und L-Glutamin durch L-Asparaginase.....	5
Abb. 3: Aktivität der L-Asparagin-Synthetase.....	6
Abb. 4: Wirkmechanismus von L-Asparaginase (modifiziert aus Mueller et al. [56])	7
Abb. 5: 5-Jahres Überlebensraten für Kinder mit diagnostizierter und behandelter ALL in den 90er Jahren von acht internationalen Studiengruppen (NOPHO (Anzahl der Studienpatienten, n=1.143), BFM (n=2.178), AIEOP (n=1.194), CCG (n=5.121), DFCI (n=377), EORTC (n=2.065), St. Jude (n=165), UKALL (2.090) (aus Treatment Protocol NOPHO-ALL 2000)	13
Abb. 6: Übersicht des Therapieprotokolls der ALL 2000 Studie der NOPHO	16
Abb. 7: IgG-Titer von Patienten mit und ohne allergische Reaktion am Ende der Induktions- und Reinduktionsphase (aus Woo et al. [88])	26
Abb. 8: Übersicht des Induktionsprotokolls (Standard- und mittlere Intensitätsrisikogruppe)....	33
Abb. 9: Übersicht des Reinduktionsprotokolls (mittlere Intensitätsgruppe) (aus Treatment Protocol NOPHO-ALL 2000)	33
Abb. 10: Glutathion-S-Transferase Fusionsvektor pGEX-6P-3.....	38
Abb. 11: Schnittstelle der PreScission Protease	41
Abb. 12: Schematischer Aufbau des GST-Fusionsproteins ELISA.....	44
Abb. 13: Länge der L-Asparaginase-Fragmente bezogen auf eine Untereinheit des Enzyms..	46
Abb. 14: Restriktionsanalyse der klonierten Fragment-DNA a 1: DNA-Längenstandard; 2: Fragment E; 3: Fragment F; 4: Fragment G; 5: Fragment H; 6: Fragment J; 7: Fragment K ; b 1: DNA-Längenstandard; 2: Fragment J; c 1: DNA-Längenstandard; 2: Fragment G.....	47
Abb. 15: Kontrolle der Expressionsschritte im SDS-PAGE von GST-Fusionsprotein H und E 1: Molekulargewichtsstandard; 2: Kulturlösung H zu Beginn; 3: Kulturlösung H nach Expression; 4: Kulturlösung H 4 h nach Induktion mit IPTG; 2: Kulturlösung E zu Beginn; 3: Kulturlösung E nach Expression; 4: Kulturlösung E 4 h nach Induktion mit IPTG.....	47
Abb.16: a Beispielhafte Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins (aus GST Gene Fusion Handbook, Amersham Biosciences), b Aufreinigung des GST-Fusionsproteins J.....	48
Abb. 17: a Kontrolle der Expression und Aufreinigung im SDS-PAGE von GST-Fusionsprotein J M: Molekulargewichtsmarker; 1: Kulturlösung J vor Expression; 2: Kulturlösung J nach Expression; 3: Kulturlösung J 4 h nach Induktion mit IPTG; 4: Eluat nach Aufreinigung.	48
Abb. 18: Antikörpertiter eines Anti-Asparaginase IgG (Kaninchen) in einer Serumverdünnung von 1:800 gegen die einzelnen GST-Fusionsproteine (E-K), GST ohne Insert, Leer: ohne Antigenzusatz und L-Asparaginase-Gesamtprotein (Asp) in einer Doppelbestimmung.....	50
Abb. 19: Median der Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine (E-K) und das Gesamtprotein (Asp) der jeweils letzten Probe aus Induktion (n=22) und Reinduktion (n=15) für Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität (n=23)	51
Abb. 20: Median der Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine (E-K) und das Gesamtprotein (Asp) der jeweils letzten Probe aus Induktion (n=16) und Reinduktion (n=19) für Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (n=19).....	52
Abb. 21: Median der Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp) für die Kontrollproben (n=14)	53
Abb. 22 : Antikörpertiter gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp) für Kontrollprobe Nr. 4	53
Abb. 23: Antikörpertiter von Patient 37 mit „stiller Inaktivierung“; im Insert ist die Serumaktivität der L-Asparaginase im zeitlichen Verlauf dargestellt	54
Abb. 24: Antikörpertiter von Patient 74 mit „stiller Inaktivierung“; Proben mit einer O.D. _{405nm} > 3,0 wurden durch stärkere Verdünnung bestimmt; im Insert ist die Serumaktivität der L-Asparaginase im zeitlichen Verlauf dargestellt	54
Abb. 25: Antikörpertiter von Patient 149 mit Enzymaktivität im therapeutischen Bereich; im Insert ist die Serumaktivität der L-Asparaginase im zeitlichen Verlauf dargestellt	55
Abb. 26: Antikörpertiter von Patient 140 mit Enzymaktivität im therapeutischen Bereich; im Insert ist die Serumaktivität der L-Asparaginase im zeitlichen Verlauf dargestellt	55

Abb. 27: Vergleich der Antikörpertiterverläufe gegen die GST-Fusionsproteine (E-K) für alle Patienten mit „stiller Inaktivierung“	57
Abb. 28: Box Plots der GST-Fusionsproteine (E-K) und des Gesamtproteins (Asp) für die Patienten mit therapeutischer Aktivität. Gegenübergestellt sind die jeweils letzten Proben aus Induktion (a) und Reinduktion (b)	58
Abb. 30: Box Plots der GST-Fusionsproteine (E-K), GST und des Gesamtproteins (Asp) für die Kontrollproben (n=13); Kontrollprobe 4 ausgeschlossen	59
Abb. 31: Antikörpertiter von Patient 146, 140 und 62 gegen die einzelnen L-Asparaginase-Fragmente vor (a) und nach (b) Abtrennung des GST-Anteils durch eine „site-specific“-Protease	62
Abb. 32: Box-Plot des GST-Titers aller untersuchten Serumproben	63
Abb. 33: Antikörpertiter gegen GST im zeitlichen Behandlungsverlauf von Patient 56	63
Abb. 34 : Antikörpertiter gegen GST im zeitlichen Behandlungsverlauf von Patient 161 und ...	64
Abb. 35: Antikörpertiter von Patienten nach einer klinischen Hypersensitivitätsreaktion.....	65
Abb. 36: Häufigkeitsverteilung der Titer gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein für die Kontrollgruppe, für Patienten mit therapeutischer Aktivität und „stiller Inaktivierung“ mit der jeweils letzten verfügbaren Probe aus Induktion und Reinduktion	66
Abb. 37: Verlauf der Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E , J und das Gesamtprotein für die Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität (n=23). Gegenübergestellt sind jeweils die letzten verfügbaren Proben aus der Induktion (n=22) und Reinduktion (n=15)	67
Abb. 38: Verlauf der Antikörpertiter gegen die Fusionsproteine E , J und das Gesamtprotein für die Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (n=19). Gegenübergestellt sind jeweils die letzten verfügbaren Proben aus der Induktion (n=16) und Reinduktion (n=19).....	67
Abb. 39: Häufigkeitsverteilung der Titer gegen das L-Asparaginase-Gesamtprotein	67
Abb. 40: Bestimmung der <i>E. coli</i> L-Asparaginase-Konzentration unter Verwendung von Patientenserum mit unterschiedlichen Antikörpertitern.....	69
Abb. 41: Antikörper-Bindung der Kontrollproben.....	70
Abb. 42: Bestimmung der Coating-Konzentration der GST-Fusionsproteine unter Verwendung eines Patientenserums	70
Abb. 43: Reaktivität des Anti-Human IgG (Sekundärantikörper) in einer Verdünnung zwischen 1:10.000 und 1:50.000, Antigen: L-Asparaginase-Gesamtprotein.....	71
Abb. 44: Reaktivität des Anti-Human IgG (Sekundärantikörper) in einer Verdünnung zwischen 1:2.500 und 1:40.000, Antigen: GST-Fusionsproteine (E-K)	72
Abb. 45: Untersuchungen zur Linearität der Antikörper-Bindung einer Serumprobe eines Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (Probe 180) und zweier Kontrollproben (Probe 2 und 3) in einer Verdünnung zwischen 1:400 und 1:12.800; Antigen: L-Asparaginase-Gesamtprotein	72
Abb. 46: Untersuchungen zur Linearität der Antikörper-Bindung einer Serumprobe eines Patienten mit „stiller Inaktivierung“ in einer Verdünnung zwischen 1:50 und 1:1.600; Antigen: GST-Fusionsproteine (E-K).....	73
Abb. 47: Untersuchungen zur Linearität der Antikörper-Bindung von Kontrollprobe 9 in einer Verdünnung zwischen 1:50 und 1:1.600; Antigen: GST-Fusionsproteine (E-K).....	73
Abb. 48: Strukturmodell der <i>E. coli</i> L-Asparaginase. Farblich dargestellt sind Untereinheiten B (hellgrün) und D (dunkelgrün) mit zwei aktiven Zentren (gelb)	86
Abb. 49: Lage der Aminosäuresequenzen am L-Asparaginase-Molekül.....	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pharmakokinetische Eigenschaften der verschiedenen L-Asparaginase-Präparate nach i.v.-Administration (aus Albertsen et al. [44], Ho et al.[35,36])	8
Tabelle 2: Pharmakokinetische Eigenschaften der verschiedenen L-Asparaginase-Präparate nach i.m.-Administration (aus Asselin et al. [8])	8
Tabelle 3: Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests für den Vergleich der Kontrollgruppe, Gruppe der therapeutischen Aktivität und „stillen Inaktivierung“ für die GST-Fusionsproteine (E-K) und das Gesamtprotein (Asp)	59
Tabelle 4: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität (n= 23) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp) aus den jeweils letzten verfügbaren Proben der Induktion (n=22) und Reinduktion (n=15).....	60
Tabelle 5: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (n= 19) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp) aus den jeweils letzten verfügbaren Proben der Induktion (n=16) und Reinduktion (n=19).....	61
Tabelle 6: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Kontrollgruppe (n=14) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen die GST-Fusionsproteine (E-K), GST und das Gesamtprotein (Asp)	61
Tabelle 7: Ergebnisse der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für den Vergleich der GST-Fusionsproteine (E bis K) mit dem L-Asparaginase-Gesamtprotein (Asp) in der Gruppe der „stillen Inaktivierung“	68
Tabelle 8: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Patienten mit therapeutischer Enzymaktivität (n=23) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen das Gesamtprotein (Asp)	68
Tabelle 9: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Patienten mit „stiller Inaktivierung“ (n=19) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen das Gesamtprotein (Asp)	68
Tabelle 10: Antikörpertiter (O.D. _{405 nm}) der Kontrollgruppe (n=14) mit Median (Md), Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) gegen das Gesamtprotein (Asp)	68
Tabelle 11: Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität durch 3-fach Bestimmung zweier Serumproben mit Mittelwert (M), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (COV)..	74
Tabelle 12: Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität durch Mitführen einer Probe auf allen Mikrotiterplatten (n=49). Dargestellt sind Mittelwert (M), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (COV) in % der GST-Fusionsproteine E-K, GST und des Gesamtproteins (Asp)	74

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bien, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Eilers, Feuser, Funk, Gerdes, Geus, Görg, Grimm, Griss, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Höffken, Hofbauer, Hofmann, Jungclas, Krieg, Kühnert, Kuhlmann, Klenk, Klose, Kretschmer, Kroll, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schnabel, Seitz, Sekundo, Seyberth, Studer, Vogelmeier, Wagner, Wagner, Weihe, Werner, Wulf.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren in Augsburg, München und Zürich:

Brandl, Bühler, Höcherl, Naumann und Waldner.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K.-H. Röhm danke ich für die Möglichkeit, die Untersuchungen innerhalb seiner Arbeitsgruppe am Institut für Physiologische Chemie in Marburg durchzuführen; ebenso danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Joachim Müller - zunächst für die Überlassung des Themas sowie für die unermüdliche und engagierte Betreuung der Doktorarbeit. Ich danke für die vielen konstruktiven Gespräche, wertvollen Anregungen und Ideen für die Laborarbeiten sowie für die sorgfältige Korrektur der Dissertation.

Unseren skandinavischen Kollegen, besonders Frau Dr. Birgitte Klug Albertsen, Department of Pharmacology, University of Aarhus danke ich für die Überlassung der Serumproben.

Für die Hilfestellung bei der statistischen Ausarbeitung der Daten danke ich Herrn Brandon Greene, Institut für Medizinische Biometrie in Marburg.

Meiner Schwester Sonja danke ich für die große Geduld bei der Erstellung der Abbildungen. Regina danke ich für die Rücksicht und Unterstützung während der Promotionszeit.

Zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern für Ihre immerwährende Unterstützung und Liebe.